



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사 학위논문

Polo-like kinase 1/FoxM1 신호 및 자식작용  
억제를 통한 제피티닙 감수성 증가효과

Enhanced gefitinib sensitivity via the inhibition  
of polo-like kinase 1/FoxM1 signaling and  
autophagy

2019 년 02 월

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

임 지 혜

Polo-like kinase 1/FoxM1 신호 및 자식작용  
억제를 통한 제피티닙 감수성 증가효과

Enhanced gefitinib sensitivity via the inhibition  
of polo-like kinase 1/FoxM1 signaling and  
autophagy

지도교수 강 건 옥

이 논문을 약학박사 학위논문으로 제출함

2019 년 02 월

서울대학교 대학원  
약학과 약물학 전공  
임 지 혜

임지혜의 약학박사 학위논문을 인준함

2019 년 02 월

위 원 장      김 상 건 (인)

부위원장      이 승 희 (인)

위      원      이 병 훈 (인)

위      원      김 형 식 (인)

위      원      강 건 옥 (인)

## 국문초록

# Polo-like kinase 1/FoxM1 신호 및 자식작용 억제를 통한 제피티닙 감수성 증가효과

임지혜

약학과

서울대학교 대학원

EGFR 인산화효소억제제 (tyrosine kinase inhibitor, TKI)는 기존의 세포독성항암제에 비해 항암 효능이 뛰어나고 독성이 현저히 적으며 경구투여가 가능하다는 장점이 있다. 이러한 장점에도 불구하고, 일부 환자는 EGFR 인산화효소억제제에 반응하지 않거나, 암의 관해 후 재발하는 경우도 빈번하다. 그러므로, 항암제 내성기전을 연구하고 내성기전을 제어하는 약물을 발굴하여 항암제 감수성을 증가시키는 연구가 필요하다. 본 학위논문에서는, EGFR 인산화효소억제제 내성 폐암 및 유방암에서 내성기전을 탐구하고 치료방안을 제시하였다. 먼저, EGFR 표적항암제인 제피티닙 혹은

엘로티닙을 6 개월동안 처리하여 배양한 비소세포성 폐암세포주를 구축하였다. 이들 세포주에서 세포성장을 측정하였을 때 제피티닙 혹은 엘로티닙 내성이 발현하였으며 동시에 상피간엽전환과 암줄기세포 활성화에 관여하는 인자의 발현이 증가하였다. 제피티닙 내성 폐암세포주(HCC827-GR)에서 세포이동능이 증가하였으며 3 차원 spheroid 형성능과 누드마우스에서 암형성능이 증가하였다. 뿐만 아니라, HCC827 정상 폐암세포주와 비교하였을 때, HCC827-GR 세포에서 암줄기세포 활성 유지에 필수적인 효소와 전사인자인 polo-like kinase(PLK) 1 과 FoxM1 의 발현이 증가하였다. FoxM1 을 유전적으로 결손시킨 HCC928-GR 세포는 암세포성장, 이동능, 및 암형성능이 대조군 대비 감소하였다. 반면, FoxM1 을 과발현시킨 HCC827 정상 폐암세포주에서는 대조군 대비 제피티닙 감수성이 감소하였다. PLK1 선택적 억제제인 BI2536 을 처리하였을 때, HCC827-GR 세포의 세포성장과 이동능이 둔화되었으며 자사세포사멸이 나타났다. HCC829-GR 이종이식 누드마우스에 주 2 회 10-30 mg/kg BI2536 을 복강투여 하였을 때, 종양의 부피가 유의적으로 감소하였으며, 암조직 절편 면역염색에서 FoxM1 발현이 감소하였다.

G protein-coupled receptor 119 (GPR119)는 소장에서 incretin 분비 및 췌장에서 인슐린분비에 관여한다고 알려져 있지만,

암에서 기능은 알려진 바 없다. 유방암세포 8 종에서 GPR119 유전자 발현을 관찰하였고, 인간 유방암 절편 면역염색에서 49 샘플 중 19 개 샘플에서 GPR119 발현을 관찰하였다. 유방암세포주에서, 제피티닙 단독처리에 비해 제피티닙/GPR119 리간드를 동시처리 하였을 때, 상가적인 암세포성장억제 효과가 나타났으며, 암세포자가 사멸 지표인 annexin V 전환, cleaved caspase-3/7 및 PARP 가 관찰되었다. 한편, 제피티닙을 처리한 MCF-7 세포에서 자식작용 활성지표인 LC3B II 발현 및 오토파고솜 생성이 증가하였다. 반면, 제피티닙 단독처리에 비해 제피티닙/GPR119 리간드를 동시처리 하였을 때, LC3B II 발현 및 형광표지 오토파고솜 생성이 감소하였다. GPR119 결손 MCF-7 세포주에서 MBX-2982 의 자식작용 억제효과는 나타나지 않았다. 나아가, MBX-2982 를 처리한 MCF-7 세포에서 총 ATP 감소 및 산화적인산화감소/해당증가를 관찰하였다. GPR119 리간드를 처리한 MCF-7 세포분획 및 배양배지에서 해당대사의 최종산물인 젖산의 축적이 관찰되었으며, 20 mM 농도의 젖산은 제피티닙에 의해 촉진된 LC3B II 발현을 감소시키고 cleaved caspase-3/7 활성을 증가시켰다. 결론적으로, EGFR 인산화효소 억제제에 장기간 노출된 폐암세포는 상피간엽전환을 유도하고 암줄기세포기능이 활성화하여 암세포성장, 전이를 촉진한다. 이러한 항암제 획득내성은 암줄기세포 기능유지에 필수적인 PLK1/FoxM1

신호를 억제하여 치료할 수 있다. 또한, 유방암세포는 EGFR 신호가 억제될 때 자식작용을 유도하여 암세포의 생존을 유지한다. 반면, GPR119 리간드는 해당대사를 촉진하여 젖산을 과다생성하고 축적된 젖산은 자식작용을 억제하여 세포티넵 감수성을 증가시킨다.

**주 요 어 (keywords):** 상피간엽전환, 암줄기세포, PLK1, 자식작용, GPR119, 젖산

**학번:** 2013-30514

# 목 차

국문초록 .....	i
목차 .....	iv
List of Tables .....	vii
List of Figures .....	viii
List of Abbreviations.....	ix
I. 서론.....	1
II. 시약 및 실험방법	
1. 시약 및 항체 .....	6
2. 세포배양 .....	6
3. 세포증식, 3D spheroid 증식 관찰 및 Caspase-3/7 활성화 관찰 .....	6
4. EGFR 유전자 돌연변이 분석 .....	7
5. 단백질샘플 및 발현분석 .....	8
6. mRNA 추출 및 발현분석 .....	9
7. 세포이동능 (cell migration) 평가 .....	9
8. 유세포분석 (flow cytometry) .....	9
9. 동물실험 .....	10
10. FoxM1 과발현 및 결손 세포주 확립 .....	11



11. Gene Expression Omnibus 및 Kaplan–Meier Plotter .....	11
12. Immunohistochemistry .....	12
13. 유방암조직분석 .....	12
14. 주사전자현미경법 (Transmission electron microscopy) .....	12
15. ATG7 siRNA 도입 .....	13
16. 오토파고솜 (autophagosome) 형광분석 .....	13
17. GPR119 결손세포주 확립 .....	13
18. cAMP 전사활성평가 .....	14
19. 1H-핵자기공명 분석 .....	14
20. 세포대사분석기 .....	14
21. 통계분석 .....	15

### III. 결과

1) 비소세포폐암 세포주에서 제피티닙 내성발현 및 EGFR 수용체 동정 .....	16
2) 제피티닙 내성 폐암 세포주에서 상피간엽전환 유도확인 .....	20
3) 제피티닙 내성 폐암 세포주에서 암줄기세포 활성증가 .....	22
4) 제피티닙 내성 폐암 세포주에서 PLK1 및 FoxM1 발현증가 및 암줄기세포 활성유지에 필수적인 FoxM1 의 기능 .....	26
5) 암줄기세포 활성유지에 필수적인 FoxM1 의 기능 .....	30
6) 유방암에서 GRP119 수용체 발현 .....	33

7) 유방암세포에서 GPR119 리간드의 제피티닙 감수성 증가효과 .....	37
8) 유방암세포에서 자식작용 촉진 및 제피티닙 내성발현 .....	41
9) GPR119 리간드의 자식작용 억제효과 .....	44
10) GPR119 리간드와 자식작용 대표조절신호 .....	48
11) GPR119 리간드가 암세포대사에 미치는 영향 .....	53
12) GPR119 리간드에 의해 증가한 젖산과 자식작용억제효과 .....	58
13) GPR119 리간드와 미토콘드리아 기능감소 .....	62
14) 기존 젖산수용체와 무관한 GPR119 리간드의 자식작용 억제효과 .....	64
 IV. 고찰 .....	 67
V. 참고문헌 .....	73
VI. Abstract .....	86

## List of Tables

Table 1. 고형암에서 EGFR TKI 효능을 평가한 임상시험모음 .....	34
--	----

## List of Figures

Figure 1. Gefitinib long-term treated HCC827-GR cells acquired gefitinib resistance and EGFR mutation in Gefitinib .....	18
Figure 2. EMT markers were increased in gefitinib long-term treated HCC827-GR cells.....	21
Figure 3. CSC markers were increased in HCC827-GR cells.....	24
Figure 4. FoxM1 mediates gefitinib resistance and PLK1 regulates FoxM1 expression in HCC827 cells.....	28
Figure 5. PLK1 inhibition suppresses gefitinib-resistant HCC827 .....	31
Figure 6. Expression of GPR119 in human breast cancer. ....	35
Figure 7. Enhanced proliferation inhibition by GPR119 agonists .....	38
Figure 8. Autophagy protects cancer cells against gefitinib treatments .....	42
Figure 9. Inhibition of gefitinib-induced autophagy by GPR119 ligand in vitro and in vivo.....	46
Figure 10. No involvement of Gas or mTOR signaling in autophagy inhibition by MBX-2982 .....	50
Figure 11. Decrease in cellular ATP content and increase in lactate production by MBX-2982 in MCF-7 cells.....	55
Figure 12. Autophagy inhibition via glycolysis-mediated excessive lactate production.....	59
Figure 13. Mitochondrial distribution of MBX-2982 and complex I inhibition.....	63

Figure 14. Roles of GPR81 and NDRG3 in autophagy inhibition by MBX– 2982 .....	65
---	----

## List of Abbreviations

3-MA: 3-methyladenine

4EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

ACC: Acetyl-CoA carboxylase

AMPK: AMP-activated protein kinase

ATG3: Autophagy related 3

ATG5: Autophagy related 5

ATG7: Autophagy related 7

CRE: cAMP responsive element

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ECAR: Extracellular acidification rate

EGFR: Epidermal growth factor receptor

GPCRs: G-protein coupled receptors

LC3B: Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta

LDH: Lactate dehydrogenase

MCT1: Monocarboxylate transporter 1

MCT2: Monocarboxylate transporter 2

MCT4: Monocarboxylate transporter 4

mTOR: mechanistic target of rapamycin kinase

NDRG3: N-myc downstream regulated gene member 3

NMR: Nuclear magnetic resonance

NSCLC: Non-small cell lung cancer

OCR: Oxygen consumption rate

OXPHOS: Oxidative phosphorylation

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerases

PBS: Phosphate-buffered saline

PI: Propidium iodide

PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PKA: Protein kinase A

p70S6K: Ribosomal protein S6 kinase B1

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

TEM: Transmission electron microscopy

TKI: Tyrosine kinase inhibitor

TNBC: Triple negative breast cancer

ULK1: Unc-51 like autophagy activating kinase 1

# I. 서론

상피세포성장인자 수용체(epithelial growth factor receptor, EGFR)의 과발현이나 비정상적 기능활성현상은 다양한 고형암에서 발견되며 암의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[1]. 따라서 EGFR 활성을 선택적으로 억제하는 항암치료제들이 개발되었으며 임상에서 효능이 입증되었다. EGFR 인산화효소는 세포내 도메인에 존재하며 돌연변이가 발생한 경우 비정상적인 세포증식을 유도한다. EGFR 인산화효소억제제 (tyrosine kinase inhibitor, TKI)는 기존의 세포독성항암제에 비해 독성이 현저히 적으며 경구투여가 가능하다는 장점이 있다[2]. 2003 년 미국식품의약청은 1 세대 EGFR 인산화효소억제제인 제피티닙 (Iressa®)을 폐암치료제로 사용을 허가하였으나 약효는 기대에 미치지 못하였다. 이후 2015 년, 제피티닙은 EGFR 엑손 19 결손 혹은 L858R 치환 돌연변이가 나타난 폐암에 대하여 일차치료제로 재승인을 받았다. 2 세대 EGFR 인산화효소억제제는 1 세대와 비교하여 약물효력이 증가하였으며 3 세대 약물은 돌연변이가 발생한 EGFR 인산화효소를 추가로 억제한다[3]. 하지만, EGFR 인산화효소억제제가 뛰어난 항암효능을 보였음에도 불구하고, 다수의



환자군에서 폐암이 재발하였다. 연구결과에 따라 다소 차이는 있지만, 비소세포성 폐암환자를 대상으로 진행한 임상시험에서 제피티닙을 투여 받은 환자군의 무진행기간 (progression-free survival)은 4-7 개월이었으며, 전체생존 기간(overall survival)은 12-19 개월이었다. 이 같은 약물반응성 변화는 암세포가 제피티닙에 대한 내성을 획득하였기 때문이며 그 기전은 다양하다. 예를 들어, 인산화효소 도메인의 추가적 돌연변이발생이나 다른 종류의 세포성장신호 수용체의 관여가 보고된 바 있다 [4, 5]. 또한, 항암제에 장기간 노출된 암세포는 이에 적응하여 형질이 전환되고 폭발적인 세포성장을 유도한다. 이때는 세포단백질, 유전자, 대사체 등에서 광범위한 변화가 관찰되며 기존 암세포와는 구별되는 세포내 신호전달체계를 유지한다. 항암제 내성을 보이는 암을 치료하기 위해서 내성의 기전을 연구하고 그 기전을 조절하는 약물을 이용하는 것이 효과적인 접근법일 수 있다.

유방암에서 EGFR 은 암세포의 성장과 유지에 기여하는 것으로 알려졌다. 따라서, 유방암환자를 대상으로 EGFR 인산화효소억제제를 투여하는 임상시험이 진행되었다. 하지만, 임상시험을 분석한 결과 EGFR 음성 유방암환자군에 비해 양성 유방암환자군에서 EGFR 인산화효소억제제의 항암효과가 큰 차이를 보이지 않았다[6, 7]. EGFR 신호계가 세포성장에 매우 중요한 역할을 차지하는 것에

비추어 볼 때, 보상기전이 발현한 것으로 추측할 수 있다. 항 EGFR 요법이 효과를 보이지 않는 원인에 대한 연구는 아직 미비하며 대안치료법 역시 수립된 바 없다. 이에 관한 연구는 새로운 신약의 개발과 암환자의 치료에 도움을 줄 수 있다.

상피간엽전환(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)은 내피세포형질을 가진 세포가 간엽세포형질로 전환되는 것이다[8]. 이때, 기원세포와 변성세포는 세포형태, 이동능변화등으로 구분할 수 있으며, 세포구조나 세포연접 단백질의 발현과 이를 조절하는 세포신호에서 명백한 차이를 나타낸다. 상피간엽전환은 원발고형암이 다른 장기로 전이할 때 나타나는 것으로 알려져 있으며 항암제 내성발현에도 관여하는 것으로 보고되었다. 암줄기세포 (cancer stem-like cell)는 암을 생성하는 능력을 가지는 특정한 세포군을 지칭하며 암이질성(heterogeneity)을 유도한다고 알려졌다[9]. 이들 암줄기세포는 다분화성(pluripotency)과 재생성(self-renewal)이 특징이며 아직 명확한 실체는 더 연구해야 할 필요성이 있다. 상피간엽전환이 진행된 세포는 암줄기세포와 유사한 특성을 가지며 실제로 상피간엽전환과 암줄기세포가 직접관련이 있음을 밝히는 논문이 보고된 바 있다[10].

Polo-like kinase (PLK)1 은 세포분열시 미세소관 활성화유지에 관여하는 serine/threonine 인산화효소이다[11]. Forkhead box M(FoxM)1 은 PLK1 에 의한 조절을 받는 전사인자이며, 줄기세포분화 및 G2/M 세포주기에 관여하는 단백질들의 발현을 증가시킨다. 혈액암이나 폐암을 비롯한 다양한 고형암에서 PLK1 및 FoxM1 활성 증가가 보고된 바 있으며, 암의 재발원인으로도 보고되었으나 자세한 기전은 더 많은 연구가 필요하다[12-15].

세포자식작용(Autophagy)는 세포 에너지 고갈 스트레스 상황에서 스트레스를 제거하고 세포내부 자원을 재활용하여 에너지를 공급하는 재생기전이다[16]. 최근 연구에서, 항암제에 노출된 암세포에서 자식작용의 유도가 관찰된 바 있으며, 그 기능에 대해서는 논란이 진행중이다. 자식작용 프로세스가 완전히 밝혀지지 않았으며, 이를 유도하거나 억제하는 약물들이 모두 항암제로 이용되기 때문에 더 많은 연구가 필요하다[17-19].

G protein-coupled receptor 119(GPR119)는 소장의 L 세포에서 incretin 분비를 촉진하고 췌장의  $\beta$ 세포에서 글루코스 의존적으로 인슐린분비를 촉진한다[20]. 따라서, GPR119 리간드는 제 2 형 당뇨병치료제로 개발되었으며, 최근에는 지방간 및 간 섬유화 치료효과

가 보고되었다[21]. 하지만, 암의 발생에서 작용하는 기전이나 항암제로서 이용가능성을 보고된 바 없다.

이러한 연구배경을 바탕으로 본 학위논문에서는 폐암에서 제피티닙 내성의 원인으로 PLK1/FoxM1 발현증가로 인한 상피간엽전환/암줄기세포 특이성을 규명하였으며, PLK1 억제제가 제피티닙 감수성을 증가시킬 수 있음을 제시하였다. 또한, 유방암에서 GPR119 리간드가 암세포에너지대사를 억제하여 젖산생성을 증가시키고, 제피티닙에 의해 촉진된 자식작용을 억제함으로써 제피티닙 감수성을 증가시킬 수 있음을 입증하였다.

## II. 시약 및 실험방법

### 1. 시약 및 항체

Gefitinib (cat. HY-50895), BI2536 (cat. HY-50698), MBX-2982 (cat. HY-15291) 및 GSK1292263 (cat. HY-12066) 는 Medchemexpress (Monmouth Junction, NJ)에서 구매하였다. Compound C (cat. P5499) 및 기타 시약은 시그마알드리치 (St. Louis, MO)에서 구매하였다. Anti-E-cadherin, anti-N-cadherin 항체는 BD Transduction (San Jose, CA)에서 구매하였다. Anti-LC3B, anti-ATG7, anti-ATG5, anti-ATG12, anti-pAMPK, anti-pACC 항체는 Cell signaling technology (Danvers, MA)에서 구매하였다. Anti-MCT1-4 및 기타 항체는 산타크루즈 (Dallas, Texas)에서 구매하였다.

### 2. 세포배양

HCC827-WT/GR 세포는 계명대학교 정철호 교수님으로부터 제공받았다. H292-WT/GR, H1993-WT/GR 및 기타 폐암세포는 서울대학교 이상국 교수님으로부터 제공받았다. 모든 폐암세포주는 10% fetal bovine serum (FBS) 및 1% penicillin/streptomycin를 첨가한 RPMI1640 배지에서 배양하였다. 제피티닙 저항성 세포주는 1  $\mu$ M 제피티닙을 포함한 배지에서 배양되었으며, 엘로티닙 저항성세포주는

1  $\mu$ M 엘로티닙을 첨가한 배지에서 배양하였다. MCF-7 및 간암세포주는 Dulbecco's modification of Eagle medium (DMEM) 배지에서 배양하였다. MDA-MB-231 세포주 및 다른 유방암세포들은 RPMI1640배지에서 배양하였다. HepG2, HepG2-X 및 Sk-hep-1 세포는 DMEM-low glucose 배지에서 배양하였다.

### 3. 세포증식, 3D spheroid 증식 관찰 및 Caspase-3/7 활성 관찰

세포증식을 관찰하기 위해서 96 well plate에 세포를 배양하고 약물을 처리한 후 Incucyte® (Essenbio science)에 장착하고 세포증식을 실시간으로 관찰하였다. 세포배양배지에 Kinetic caspase-3/7 시약 (cat. 4440, Essenbio science)을 첨가하여 apoptosis가 유도된 세포가 녹색형광을 발산하도록 하였다. Spheroid 생성을 평가하기 위해서 ultralow attachment(ULA) plate에 세포를 분주하고 200 rpm, 5분 원심분리하였다. 96시간 배양 후 형성된 spheroid의 사진을 찍었으며 지름을 측정하고  $\text{volume} = 0.5 \times \text{단경}^2 \times \text{장경}$  공식을 이용하여 spheroid 부피를 계산하였다.

### 4. EGFR 유전자 돌연변이 분석

1.5ml EP 튜브에 세포를 포집하고 0.1 ml genomic DNA 분리 완충액 (100 ml 중 조성: proteinase K, 10 ml 10% SDS, 2 ml 5 M NaCl, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), 5 ml 1 M Tris-Cl (pH 8.0))

을 첨가 후 55 °C에서 2시간 배양하였다. 추가로 100 µl 5 M NaCl을 첨가하고 15000 rpm, 30분 원심분리 하였다. 상등액을 다른 튜브로 옮기고 70 µl isopropanol을 첨가 후 15000 rpm, 30분 원심분리 하였다. 상등액을 제거하고 남은 분획은 70% ethanol로 세척하고 50 µl 멸균증류수로 재현탁하였다. EGFR point mutation primer를 이용하여 PCR을 수행한 후 염기서열분석을 진행하였다.

## 5. 단백질 샘플 준비 및 발현분석

세포를 차가운 PBS로 세척하고 EBC 세포용해 완충액(50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 5 mM EDTA, protease inhibitors, phosphatase inhibitors)를 첨가 후 1시간 처리 하였다. 16000 g, 4 °C 원심분리 후 상등액을 새로운 튜브로 옮기고 1x promeasure solution으로 단백질을 정량하였다. 동일한 량의 단백질상등액을 분주하고 6x 샘플희석 완충액을 첨가 후 100 °C, 5분 간 끓여서 단백질샘플을 준비하였다. 단백질샘플은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)방법으로 분리하였으며, nitrocellulose membrane으로 trnasfer되었다. 5 % skim milk blocking, 1<sup>st</sup> antibody, 2<sup>nd</sup> antibody를 처리하고 horseradish peroxidase solution으로 발색 시킨 후 LAS-mini(GE Healthcare Life Sciences)로 발광사진을 찍어서 저장하였다. 단백질 밴드의 발광정도를 multi gauge 분석프로그램을 이용하여 측정하고

단백질 발현량을 정량하였다.

## 6. mRNA 추출 및 발현분석

샘플의 total mRNA는 TRIzol® (Invitrogen, cat. 15596026)을 이용하여 분리하였으며, 실험방법은 제품과 함께 제공된 문서를 따랐다. 획득한 total mRNA는 RT Premix® (iNtRON, cat. 25081)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. Conventional PCR은 PCR Premix® (iNtRON, cat. 25081)를 이용하였으며, T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad)에서 DNA를 증폭시키고 2% agarose gel에서 전기영동시키고 5분 EtBr염색후 ChemiDoc® (Bio-Rad)로 이미지를 획득하였다. Real-time PCR은 SYBR master mix (Applied biosystems, cat. 4309155)를 사용하였으며, CFX96 Touch™ Real-Time system (Bio-Rad)을 이용하여 실시간으로 분석되었다.

## 7. 세포이동능(cell migration) 평가

암세포는 ClearView 96 Well Chemotaxis Plate (Essenbioscience, cat. 4582)에 분주하였으며, IncuCyte® Chemotaxis Software를 이용하여 암세포의 이동능을 실시간으로 관찰하고 분석하였다. Plate하단부에 0.25% 콜라겐피막을 도포하고 10% FBS를 화학주성제로 사용하였다.

## 8. 유세포분석(flow cytometry)



암세포에 트립신을 처리하여 개별세포로 만들었으며, 유세포 분석기기는 FACS calibur (BD science, Franklin Lakes, NJ)를 사용하였다. 표면마커분석을 하기 위해서 항체를 1:50으로 희석한 염색 완충액(2.5% FBS, 0.1% NaN<sub>3</sub>, PBS)에서 15분간 염색하고 2번 세척 후 분석하였다. 세포자가사멸 분석을 하기 위해서 1 µg/ml propidium iodide (PI), anti-annexin-V-FICT 1:50으로 희석한 염색 완충액(10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>)에서 15분간 염색하고 2번 세척 후 분석하였다. 세포주기분석(cell cycle analysis)을 수행하기 위해서 개별세포는 70% 에탄올고정후 세척하였다. 염색 완충액(0.1 % Triton X-100, 0.2 mg/ml RNase A, 1 µg/ml propidium iodide, PBS)에서 10분 염색하고 분석하였다.

## 9. 동물 실험

동물실험은 서울대학교 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 계획서를 승인을 받고 수행하였다. 실험동물은 나라바이오텍(주)에서 구매하였고, 서울대학교 종합약학연구소 실험동물실에서 사육하였다. 구입 후 순화기간(1주일)을 두었으며, 항온, 항습을 유지하고 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 1) *in vivo* 암형성능 확인 (승인번호: SNU-170724-3): 5주령 수컷 BALB/c-nu 마우스의 양 옆구리에 각각 HCC827-WT(좌), HCC827-GR(우)세포를 접종하고 6주 후에 암형성 유무를 확인하였다. 2) HCC827-GR 이종이식모델 (승인번호:

SNU-170724-3): 5주령 수컷 BALB/c-nu 마우스의 옆구리에  $5 \times 10^6$  HCC827-GR 세포를 주입하였다. BI 2536은 10 mg/kg, 30 mg/kg 농도로 주 2회 복강투여 하였다. 3)MCF-7 이종이식모델 (승인번호: SNU-140106-1): 5주령 암컷 BALB/c-nu 마우스의 옆구리에  $5 \times 10^6$  MCF-7 세포를 Matrigel®에 현탁하여 주입하였다. 1  $\mu$ g/kg estrogen을 실험기간동안 복강투여하였다. 주 5회 10 mg/kg MBX-2982, 10 mg/kg gefitinib을 단독 또는 병용하여 경구투여 하였다. 4)HepG2-X 이종이식모델 (승인번호: SNU-140106-1): 5주령 수컷 BALB/c-nu 마우스의 옆구리에  $5 \times 10^6$  HepG2-X 세포를 주입하였다. 주 5회 10 mg/kg MBX-2982, 10 mg/kg sorafenib을 단독 또는 병용하여 경구투여 하였다.

## 10. FoxM1 과발현 및 결손세포주 확립

FoxM1 과발현 세포주를 만들기 위해서 아주대학교 의과대학 박태준 교수님으로부터 FoxM1b 플라스미드를 제공받았다. FoxM1 결손세포주를 만들기 위해서 Crispr-cas9을 이용한 FoxM1 knockout system: Lipofectamine™ CRISPRMAX™ (Thermofisher, cat. CMAX00001)을 이용하여 cas-9, guideRNA, tracer 를 도입하였다.

## 11. Gene Expression Omnibus(GEO) 분석 및 Kaplan-Meier

## Plotter

GEO 분석은 National Center for Biotechnology Information에서 제공하는 공개자료를 이용하였다. 분석 유전자들은 동일한 실험자료에서 actin으로 표준화를 수행한 후 분석되었다. 생존율 분석은Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com>)에서 제공하는 공개자료를 이용하였다.

## 12. 유방암조직시료

충남대학교 의과대학 홍장희교수님 연구팀에서 Institutional Review Board 승인을 받았으며 규정에 따라 진행되었다(승인번호: CNUH 2015-03-001). 49종 인간 유방암조직 파라핀블록에서 GPR119를 IHC염색하고 광학현미경으로 이미지를 얻은 후 GPR119 발현유무 및 제공받은 질병정보간 상관성을 SPSS프로그램으로 분석을 시행하였다.

## 13. 주사전자현미경법(Transmission electron microscopy)

오토파고좀 구조관찰은 서울대학교 농업생명기기원에서 제공하는 주사전자현미경법에 따라 수행되었다. 세포는 karnovskys fixative로 고정되었으며, 0.05 M 카코딜레이트 완충액으로 세척 후 2 % osmium tetroxide post-fixation 하였다. 샘플은 증류수로 세척

하고, 0.5 % 우라닐아세테이트로 염색 후 에탄올 및 프로필렌 옥사이드로 탈수시켰다. 샘플에 spur's resin을 첨가한 후 70 °C에서 중합하였다. 블록은 ultramicrotome (EM UC7, Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 초박편으로 만들었으며, 주사 전자 현미경 (JEM1010, JEOL, Tokyo, Japan)으로 이미지를 획득하였다.

#### 14. ATG7 siRNA Transfection

siGENOME ATG7 (cat #. MQ-020112-01-0002, Dharmacon) 및 scramble (cat #. D-001206-13-05, Dharmacon)는 FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI)를 사용하여 세포에 도입하였다.

#### 15. Autophagosome 형광분석

GFP-LC3 plasmid는 플로리다 대학교 김재승 교수님으로부터 제공받았다. mCherry-GFP-LC3 plasmid는 서울대학교 생명과학부 유승민 박사님으로부터 제공받았다. Plasmid는 FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI)를 사용하여 세포에 도입되었으며 iRIS™ 형광현미경 (Logos Biosystems), 또는 Incucyte™을 이용하여 이미지를 분석하였다.

#### 16. Lenti-virus GPR119 knockout system

GPR119 (cat #. SHCLNV-NM\_178471, Sigma-Aldrich) 및 Nontarget control (cat #. SHV0002, Sigma-Aldrich)를 이용하여 세포에 감염시켰으며 puromycin 저항성을 가지는 세포를 선별하였다.

## 17. CRE-luciferase 활성분석

CRE-luciferase plasmid는 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)를 사용하여 세포에 도입되었다. Luciferase reporter assay 시스템 (Promega, Madison, WI)과 Tristar LB 941 luminometer (Berthold tech., Bad Wildbad, Germany)기기를 이용하여 luciferase 활성을 측정하였다.

## 18. $^1\text{H}$ -핵자기공명

세포는 메탄올에 현탁하여 수집하고, 배지는 동량의 메탄올을 첨가하여 진공원심농축기로 건조시켰다. 농축분획은  $^1\text{H}$ -MNR D<sub>2</sub>O 완충액(2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.025 % trimethylsilyl propionate)에 녹이고, Bruker 500 MHz 분광기 (Bruker Cooperation, Billerica, MA)로 분석하였다. 젯산의 농도분석은 서울대학교 박성혁교수님 연구팀과 협연하였다.

## 19. XFp 세포대사분석기

산화적인산화/해당 세포대사는 XFp 분석기 (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA) 시스템을 사용하여 관찰하였다.  $3 \times 10^3$  세포를 XFp 플레이트에 분주하고 시험 1 시간 전에 XFp 배지로 바꾸어 주었다. 모든 시약 및 분석 조건은 XFp mitostress test kit(Seahorse Bioscience)에서 제공하는 프로토콜을 준수하였다.

## 20. 통계분석

데이터는 평균  $\pm$  S.D. 또는 S.E. 로 표시한다. 실험군의 유의성은 Student's t-test 혹은 ANOVA 수행 후  $p$ -value 로 표시한다. \*  $p < 0.05$  또는 \*\*  $p < 0.01$  또는 \*\*\*  $p < 0.005$  순서로 표시한다.

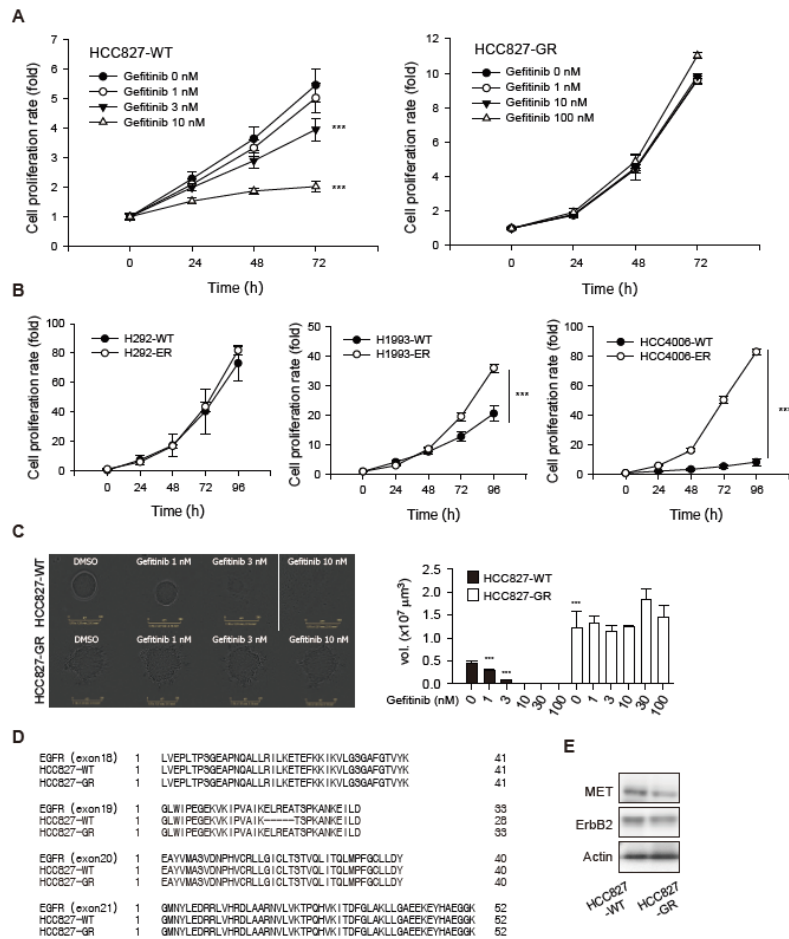
### III. 결 과

#### 1) 비소세포폐암 세포주에서 제피티닙 내성발현 및 EGFR 수용체 동정

비소세포성 폐암세포주 HCC827-WT 세포는 EGFR 엑손 19 돌연변이를 가지며 EGFR 신호 과다활성을 나타낸다. FBS 를 첨가한 배지에서 제피티닙 처리 농도에 따른 HCC827-WT 세포성장억제 효과를 관찰하였을 때, 제피티닙 3 nM 부터 유의적인 세포성장억제가 나타났으며 10 nM 에서 90% 이상 세포성장이 억제되었다 (Figure 1A, 좌). 반면, HCC827-WT 세포에 1 nM-1  $\mu$ M 제피티닙을 6 개월간 증적 배양하여 확립한 HCC827-GR 세포는 1-100 nM 제피티닙에 감수성을 보이지 않았다 (Figure 1A, 우). 다른 비소세포성 폐암세포인 H292-WT, H1993-WT, HCC4006-WT 세포 및 엘로티닙을 증적 배양하여 확립한 H292-ER, H1993-WR, HCC4006-ER 세포의 세포성장을 비교하였을 때, H292-WT/ER 세포를 제외하고, 엘로티닙을 장기처리한 세포들의 세포성장이 크게 증가한 것을 관찰하였다 (Figure 1B). 또한, ULA 배양접시에 1000 개 세포를 분주하고 96 시간이 지난 후, 3D spheroid 형성정도를 비교해 보았을 때, 모세포에 비해, HCC827-GR 세포 spheroid 부피가 유의적으로 증가하였으며, 제피티닙의

항암효과가 감소하였다 (Figure 1C). 제피티닙 내성의 원인으로 EGFR T790M 돌연변이나 MET 또는 ErbB2 발현증가가 알려진 바 있다[22]. 이를 확인해 보기 위해서 HCC827-WT/GR 세포의 EGFR 엑손 18-21 유전자분석을 수행하였다. 유전자 분석에서 HCC827-WT 세포는 엑손 19 에 결손(deletion)이 발생했으며 이는 알려진 사실과 같다[23]. HCC827-GR 세포의 EGFR 유전자서열이 정상 EGFR 유전자서열과 동일하게 회복된 것을 알 수 있었다 (Figure 1D). 대조 세포로 사용한 H1975 는 엑손 20 번 트레오닌이 메티오닌으로 치환되었으며 이는 제피티닙의 내성과 연관성이 있는 것으로 보고된 바 있다[24]. 이러한 결과는 항암제에 노출된 암세포에서 유전자 손상 및 복구기전이 관여하여 항암제 내성을 가지는 암세포가 선별적으로 살아남게 됨을 의미한다. 한편, HCC827-WT 과 비교하여, HCC827-GR 세포에서 MET 발현은 조금 감소하였으며, ErbB2 발현은 거의 변화가 없었다 (Figure 1E).





**Figure 1. Gefitinib long-term treated HCC827-GR cells acquired gefitinib resistance and EGFR mutation in Gefitinib**

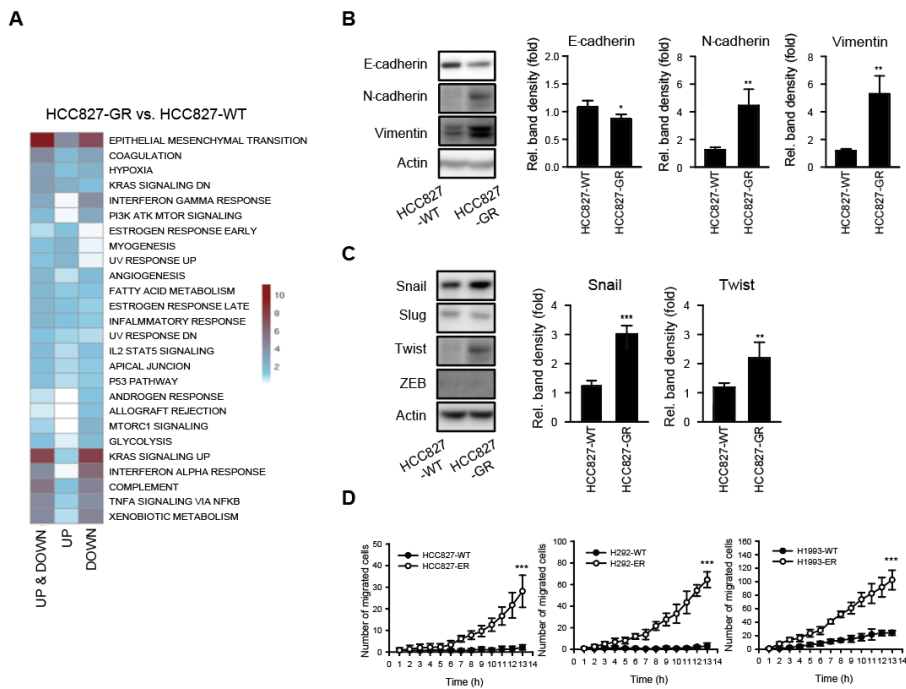
(A and B) Cell proliferation rate was determined using real time cell imaging system. (C) Spheroid formations were detected using real time cell imaging system. (D) Amino acid sequence alignments of EGFR tyrosine kinase domain. (E) Protein

expressions of MET, HER2 and Axl were by western blot analysis.

Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3)\*\*\* $p < 0.005$ , significantly different from control group.

## 2) 제피티닙 내성 폐암 세포주에서 상피간엽전환 유도확인

앞서 결과에서 보이는 EGFR TKI 내성세포는 기원세포와 EGFR 발현, 세포성장속도 및 약물반응성 등이 전혀 다르게 나타났기 때문에, 암세포의 내성원인이 한가지에 국한되지 않고 광범위한 변화가 일어났을 것이라고 추측하였다. 이러한 가설을 확인하기 위해서 HCC827-WT/GR 세포의 RNA 염기서열 분석을 수행하였다 (Figure 2A). 흥미롭게도, 두 세포에서 발현차이를 보이는 RNA 를 추출하여 유관성을 분석하였을 때, 상피간엽전환 관련 유전자의 발현이 가장 많이 변한 것으로 나타났다. 실제로 단백질 전기영동을 수행하였을 때, HCC827-WT 세포에 비해 HCC827-GR 세포에서 E-cadherin 발현감소와 N-cadherin 및 vimentin 발현증가가 관찰되었으며 이는 간엽형 세포로 형질전환되었음을 의미한다 (Figure 2B). 또한, 이러한 상피-간엽세포 특이적 지표의 전사를 지배하는 전사인자들을 확인하였을 때, snail 및 twist 발현증가가 관찰되었고 slug 및 ZEB 발현은 유의적인 변화가 나타나지 않았다 (Figure 2C). 상피형 세포에 비해 간엽형 세포는 세포이동능이 증가한다고 알려졌다[25]. Transwell 어세이를 수행하였을 때, 제피티닙 혹은 엘로티닙 내성세포의 세포이동능이 유의적으로 증가하였으며 이는 간엽형 세포로 변한 것을 의미한다 (Figure 2D).



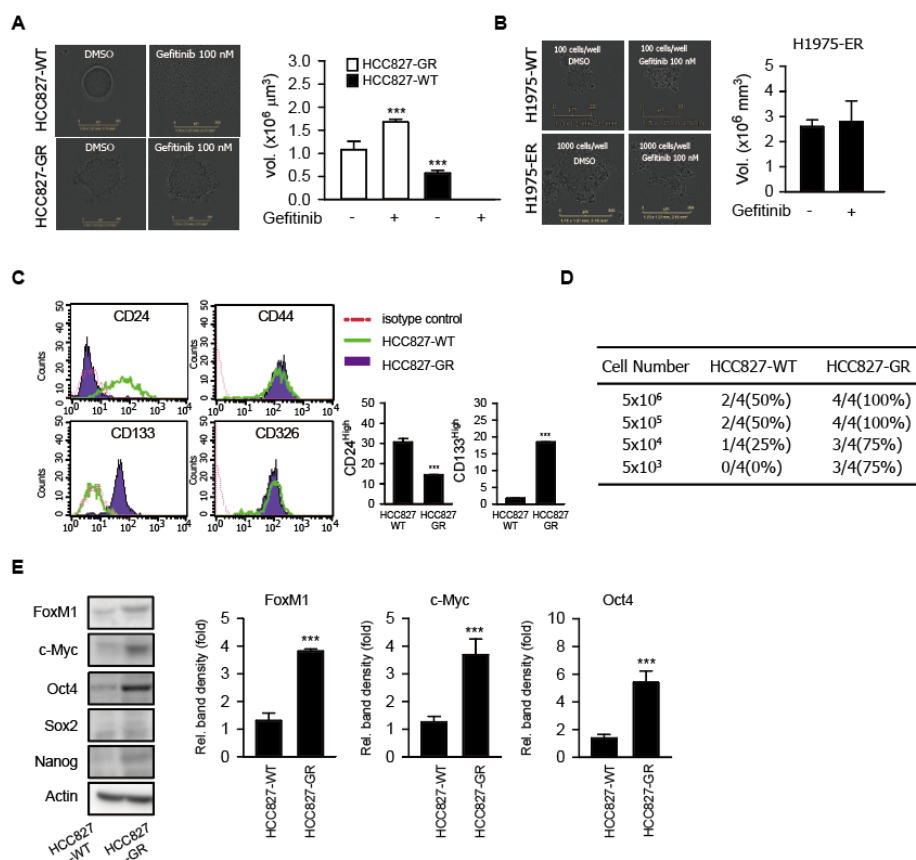
**Figure 2.** EMT markers were increased in gefitinib long-term treated HCC827-GR cells.

(A) RNA sequencing and differential expression gene analysis (B) Protein expressions of EMT marker were detected by western blotting analysis (C) Protein expressions of transcription factors related with EMT were detected by western blotting analysis (D) Transwell migration assay was determined using real-time cell imaging system. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) \*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.005, significantly different from control group.

### 3) 제피티닙 내성 폐암 세포주에서 암줄기세포 활성증가

ULA plate 에 100 개의 세포를 분주하고 96 시간 동안 배양하였다. HCC827-WT 세포는 비교적 부드러운 표면의 spheroid 를 형성하였고, 100 nM 제피티닙을 처리한 배지로 배양하였을 때는 spheroid 가 생성되지 않았다(Figure 3A). HCC827-GR 세포는 HCC827-WT 세포에 비해 유의적으로 큰 부피의 spheroid 를 생성하였으며 표면에 세포가 뺏어나간 돌기가 관찰되었다. 또한, 100 nM 제피티닙 처리시 오히려 유의적으로 부피가 증가하였다(Figure 3A). 추가적으로 H1975 세포는 1000 개 세포일 때 spheroid 를 생성하였고 제피티닙을 처리하였을 때 spheroid 부피의 감소가 나타나지 않았다 (Figure 3B). 하지만 100 개 세포일 때 spheroid 를 생성하지 않았으며 제피티닙을 첨가한 배지에서도 spheroid 를 생성하지 않았다 (Figure 3B). 이러한 결과는 HCC827-GR 세포가 적은 숫자의 세포로도 3D 환경에서 암을 발생시킬 수 있으며 제피티닙을 처리하였을 때 암 형성능이 오히려 증가하고 암줄기세포로 기능함을 의미한다. 또한, HCC827-GR 세포에서 암줄기세포 분화지표로 알려진 Cluster of differentiation(CD) 발현을 조사하였을 때, CD133<sup>high</sup> population 증가 및 CD24<sup>low</sup> population 감소를 확인하였다 (Figure 3C). 더불어 누드마우스에 암세포 집중세포수를 다르게 하여 이식하고

6 주후 암형성 유무를 평가하였을 때 HCC827-GR 세포의 암형성능이 증가함을 확인하였다 (Figure 3D). CSC 의 특징을 매개한다고 보고된 전사인자의 발현을 조사하였다. HCC827-GR 세포에서 HCC827-WT 세포에 비해 FoxM1, c-Myc, Oct4 등의 전사인자 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다(Figure 3E).



**Figure 3. CSC markers were increased in HCC827-GR cells**

(A and B) Spheroid formations were detected using real-time cell imaging system. (C) CD markers related with CSC were detected by flow cytometry analysis (D) Tumor formation ability of cancer cells was evaluated in vivo. 4 mice in each group were inoculated with HCC827-WT cells (left flank) and HCC827-GR cells (right flank) (E) Protein expressions of transcription factors related

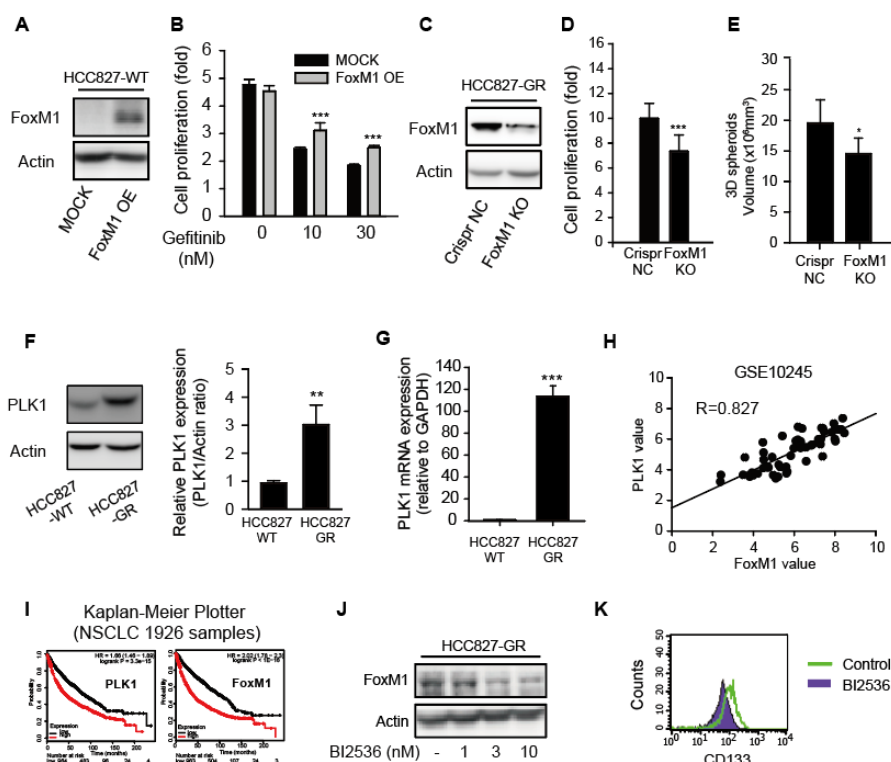
with CSC were detected by western blotting analysis. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) \*\*\* $p$  <0.005, significantly different from control group.



#### 4) 제피티닙 내성 폐암 세포주에서 PLK1 및 FoxM1 발현증가 및 암줄기세포 활성유지에 필수적인 FoxM1의 기능

FoxM1 은 상피간엽전환에서 중요한 것으로 알려진 전사인자들의 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며, 암줄기세포 유지에 중요한 전사인자들의 발현에도 관여하는 것으로 보인다. FoxM1 은 제피티닙 내성 폐암세포에서 MET 의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다 [26]. 하지만 본 연구에서 사용된 제피티닙 내성 세포에서는 MET 의 발현은 증가하지 않았다. HCC827-WT 세포에 FoxM1 을 발현시키고 제피티닙을 처리하였을 때 대조군에 비해서 세포성장억제효과가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Figure 4A and 4B). 반대로, HCC827-GR 세포에서 FoxM1 을 유전적으로 불활성화 시켰을 때 대조군에 비해서 유의적인 성장억제 효과를 관찰하였다(Figure 4C and 4D). FoxM1 의 전사인자 활성화는 PLK1 과 CDK1 에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다. HCC827-GR 세포에서 HCC827-WT 세포에 비해 PLK1 protein 발현 및 mRNA 발현 또한 높은 것을 확인하였다 (Figure 4E and 4F). GEO 분석을 통해 human NSCLC 샘플에서 PLK1 과 FoxM1 발현사이에 선형관계가 있음을 확인하였다 (Figure 4G). Kaplan-Meier Plotter 분석을 통해서 PLK1 과 FoxM1 의 높은 발현이 각각 폐암 생존율을 현저히 낮추는 것을 확인하였다 (Figure

4H). 참고로 BI2536 은 Advanced or Metastatic NSCLC 환자를 대상으로 임상 2 상을 진행중이다. 실제로 PLK1/FoxM1 조절이 되는지 확인하기 위해서 HCC827-GR 세포에 PLK1 억제제인 BI2563 을 처리하였을 때 FoxM1 의 발현이 감소하였다 (Figure 4J). CD133<sup>high</sup> population 역시 감소하였음을 확인하였다 (Figure 4K). PLK1/FoxM1 신호전달이 HCC827-GR 세포에서 중요함을 알 수 있었다.



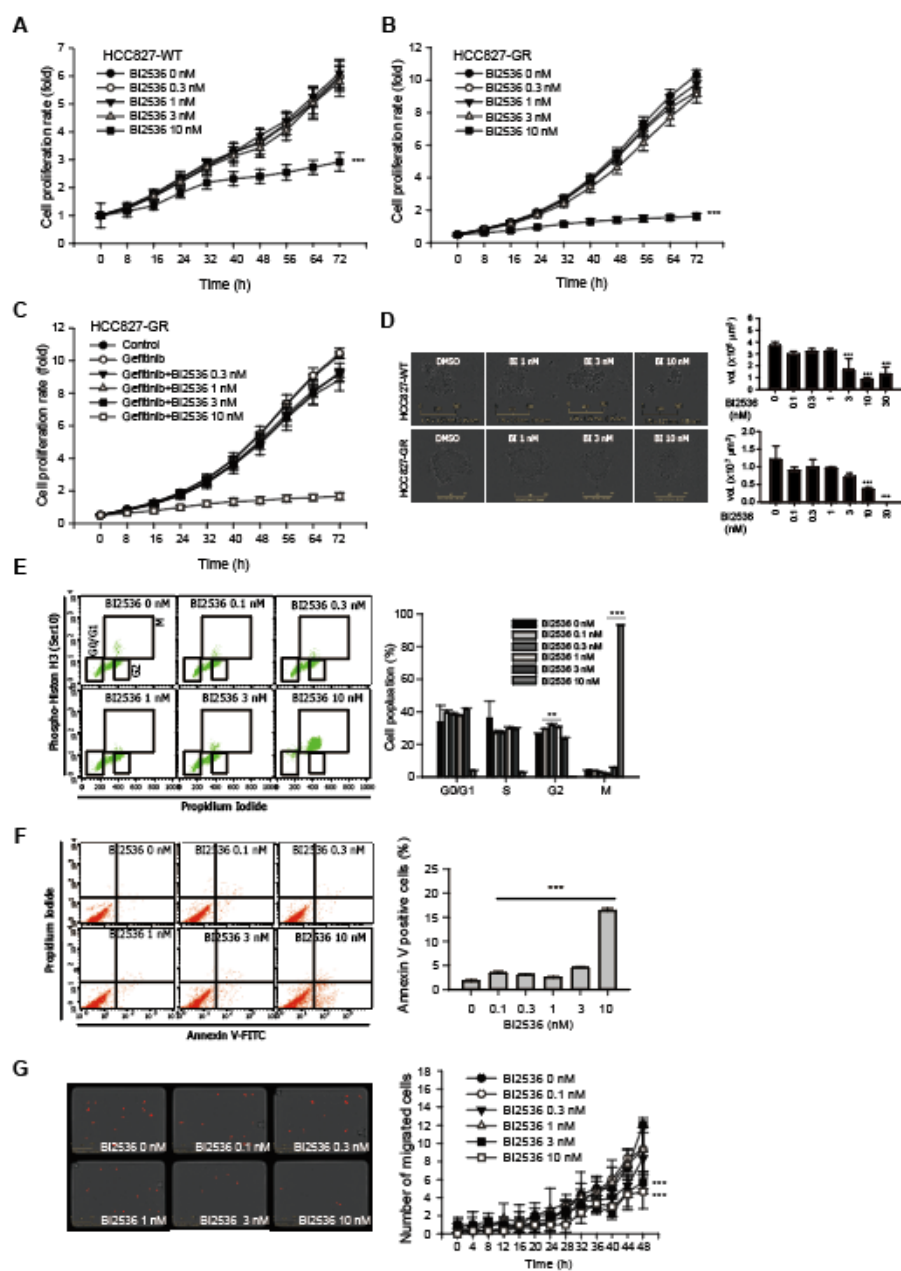
**Figure 4. FoxM1 mediates gefitinib resistance and PLK1 regulates FoxM1 expression in HCC827 cells.**

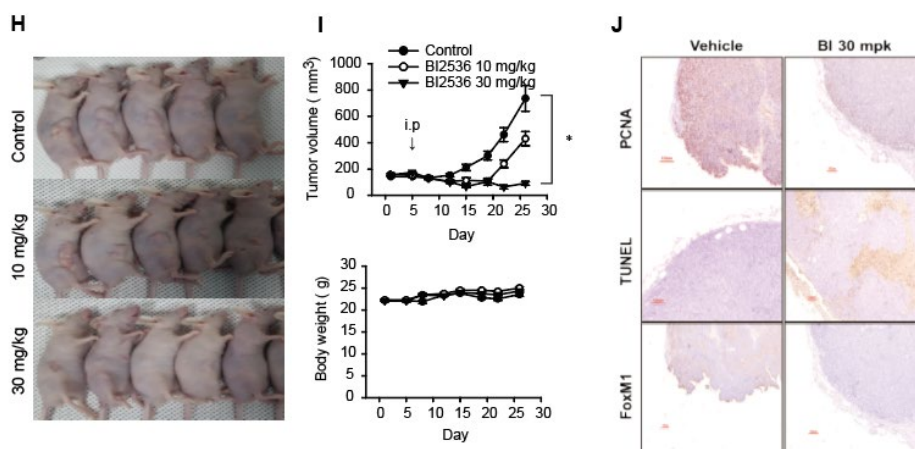
(A and B) HCC827-WT cell was transfected with FoxM1 expression vector for 48 h (A) and then treated with gefitinib for additional 48 h (B). Cell proliferation was determined using real-time cell imaging system. \*\*\* $p < 0.005$ , significantly different from control group. (C and D) FoxM1 was genetically attenuated in HCC827-GR cell (C) and then cell proliferation was determined

using real-time cell imaging system. \*\*\* $p < 0.005$ , significantly different from control group. (E) PLK1 protein expression was detected by western blotting analysis in HCC827-WT and HCC827-GR cells. \*\* $p < 0.01$ , significantly different from control group. (F) PLK1 mRNA was detected by real-time PCR in HCC827-WT and HCC827-GR cells. \*\*\* $p < 0.005$ , significantly different from control group. (H) A correlation between PLK1 and FoxM1 was determined from GEO analysis of human NSCLC samples. Pearson correlation coefficient(R) between the two values was calculated using Sigma plot. (I) Significant correlations of NSCLC patient survival rate and PLK1 expression(left) or FoxM1(right) were accomplished from Kaplan-Meier Plotter. (J) Cells were treated with BI2536 for 24 h and then FoxM1 expression was detected by western blotting analysis. (K) Cells were treated with BI2536 for 36 h and then CD133 marker was detected by flow cytometry analysis.

## 5) 제피티닙 내성 폐암의 치료표적으로서 PLK1/FoxM1 신호억제 효과

HCC827-WT 세포성장억제에 대한 BI2536 의 IC50 값은 7.0 nM 이었으며, HCC827-GR 세포에서 IC50 값은 4.0 nM 로 관측되었다 (Figure 5A and 5B). 하지만, HCC827-GR 세포에서 제피티닙과 BI2536 의 상가적인 세포성장억제효과는 관찰되지 않았다 (Figure 5C). HCC827-GR spheroid 는 3 nM BI2536 처리하였을 때 유의적으로 크기가 감소하였다 (Figure 5D). 세포주기를 관찰하였을 때, HCC827-GR 세포에 BI2536 처리시 BI2536 의 작용기전으로 알려진 G2/M arrest 세포증가가 관찰되었다 (Figure 5E). BI2536 은 HCC827-GR 세포에서 annexin V-FITC 표지 된 세포를 증가시켰으며 (Figure 5F), 암세포이동능 역시 억제하였다(Figure 5G). 누드마우스에  $5 \times 10^6$  HCC827-GR 세포를 접종하고 BI2536 을 주 2 회 복강투여 하였을 때 30 mg/kg 에서 유의적으로 암성장이 감소하였으며, 암조직 면역염색에서 세포성장지표인 PCNA 감소, 세포사지표인 TUNEL 증가 및 FoxM1 감소를 확인하였다 (Figure 5H). 따라서, PLK1 선택적 억제제 BI2536 이 제피티닙 내성 폐암세포를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.





**Figure 5. PLK1 inhibition suppresses gefitinib-resistant HCC827**

(A, B and C) Cell proliferation rate was determined using real time cell imaging system. (D) Spheroid formations were detected using real-time cell imaging system. (E) Cell cycle was analyzed by PI staining in HCC827-GR cells (F) Apoptosis was determined by PI and annexin V staining. The stained cells were analyzed by flow cytometry in HCC827-GR cells. Annexin V-positive cells were counted by BD CellQuest Pro software. (G) Transwell migration assay was determined using real-time cell imaging system. \*\*\* $p < 0.005$ , significantly different from control group. (H, I and J) Xenograft with HCC827-GR cells. Tumor volumes of mice were measured by digital caliper. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$ , significantly different from control group.

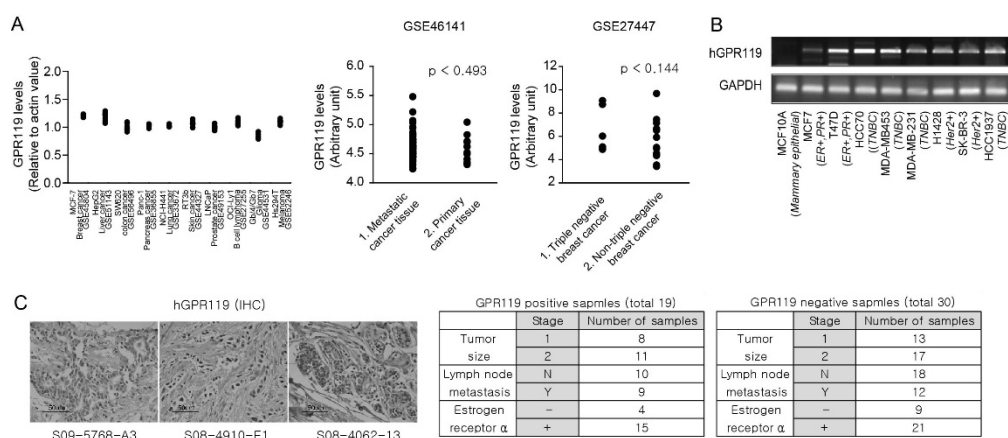
## 6) 유방암에서 GRP119수용체 발현

제피티닙은 2017년 폐암에 공식적으로 사용되는 치료제이지만 다른 암종에 대해서도 임상시험이 진행 중이다 (Table 1). 대장암, 유방암등에서 EGFR TKI에 대한 대규모 임상시험이 시도되었으며 임상결과들이 보고되었다. 동시에, 제피티닙에 대한 감수성을 보이는 환자군과 보이지 않는 환자군을 선별하여 치료효과를 극대화하고 신약을 개발하고자 하는 후속연구도 활발히 진행 중이다 [27, 28]. 다른 한편으로, 암세포에서 GPR119 수용체의 발현을 조사한 연구는 아직 없다. 먼저 GEO 분석을 통해서 다양한 사람 암세포주에서 GPR119 발현을 조사하였다. 유방암 세포주, 간암 세포주 등 다양한 암 세포주에서 GPR119 수용체가 발현함을 알 수 있었다 (Figure 6A). 사람 유방암조직을 분석한 샘플에서 GPR119 수용체 발현 패턴을 분석하였지만 유방암분류에 따른 GPR119 수용체의 특징적인 패턴이 나타나지는 않았다 (Figure 6A). 다양한 유방암 세포주에서 GPR119 mRNA를 정량하였을 때 호르몬수용체 발현과 무관하게 GPR119 mRNA를 관찰하였다 (Figure 6B). 49명의 유방암환자에서 얻은 암조직에서 면역조직염색을 통해서 GPR119 발현을 조사하였다. 이 중에서 19명의 암조직에서 GPR119 수용체의 발현이 관찰되었으며 종양크기, 림프전이 혹은 에스트로겐 수용체와 유의적인 상관성은 얻어지지 않았다 (Figure 6C).



Identifier	Condition	Intervention	Phase	status
NCT02447419	Solid Tumor (Breast cancer)	Gefitinib	Phase 2	Recruiting
NCT03170180	Stomach Neoplasms	Gefitinib Sunitinib Imatinib	Phase 2	Recruiting
NCT02013089	Gastrointestinal Cancers	Gefitinib Imatinib		Recruiting
NCT02723578	Metastatic Colorectal Cancer	Erlotinib,Pemetrexed	Phase 2	Active
NCT02788201	Urothelial Carcinoma	Gefitinib 포함 75개 항암제	Phase 2	Recruiting
NCT02836847	Cholangiocarcinoma	Gefitinib 포함 8개 항암제	Phase 2	Recruiting
NCT02551718	Acute Leukemia	Gefitinib 포함 50개 항암제	ex vivo study	Recruiting

Table 1. 고형암에서 EGFR TKI 효능을 평가한 임상시험모음



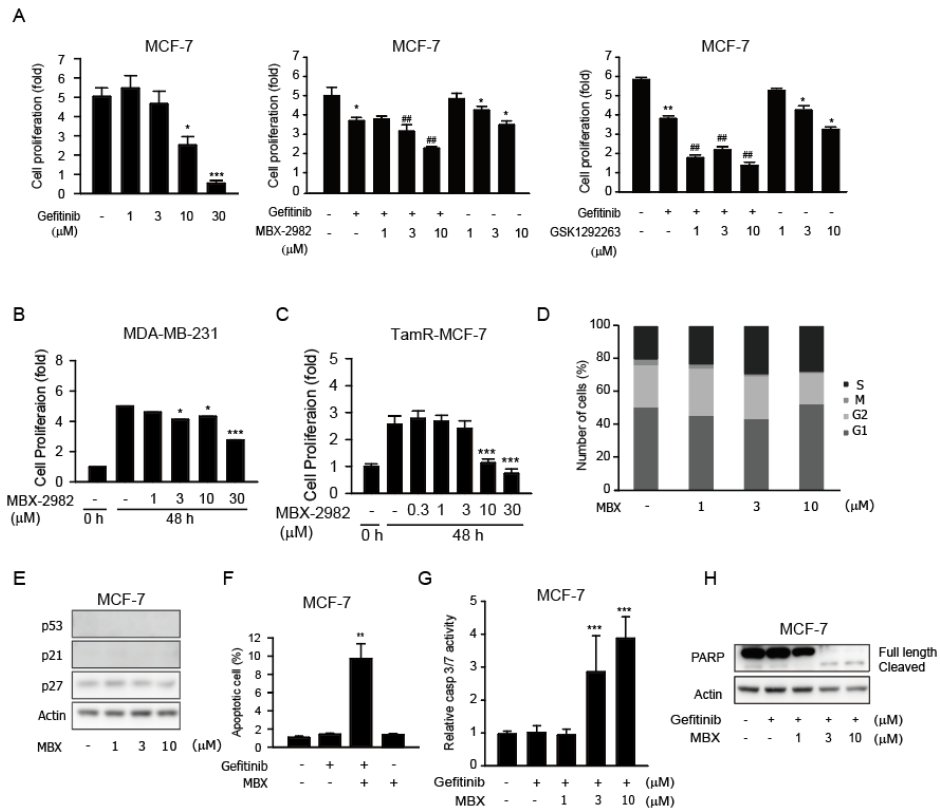
**Figure 6. Expression of GPR119 in human breast cancer.**

(A) GEO profiles of GPR119 in human breast cancer. Left, relative mRNA levels of GPR119 in human cancer cell lines; Middle, GPR119 mRNA expression in metastatic and primary breast cancer tissues; Right, GPR119 mRNA expression in triple negative breast cancer (TNBC) and Non-TNBC tissues. (B) Expression levels of GPR119 mRNA in various human breast cancer cell lines were verified by RT-PCR. MCF10A cells were used as normal mammary epithelial cells. mRNA levels of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were determined as a loading control (C) GPR119 expression was confirmed by immunohistochemistry in 49 human breast cancer tissues. Representative images of human breast cancer tissues

(left). pathological classification tables of GPR119-positive and -negative breast cancer tissues (right).

## 7) 유방암세포에서 GPR119리간드의 제피티닙 감수성 증가효과

MCF-7 유방암세포에서 제피티닙을 처리한 후 세포성장을 관찰하였을 때, 대조군에 비해 10  $\mu$ M에서 50% 세포성장이 감소되었다 (Figure 7A, 좌). 이는 폐암세포에 비해 MCF-7 유방암세포가 제피티닙 내성을 가짐을 의미한다. 반면, GPR119 리간드인 MBX2982를 동시처리를 하였을 때 제피티닙의 세포성장억제효과가 증가함을 관찰하였다(Figure 7A, 가운데). 또다른 GPR119 리간드인 GSK1292263을 제피티닙과 동시처리 하였을 때 역시 동일한 효과를 보였다(Figure 7A, 우). MBX-2982는 단독처리하였을 때, 3중음성유방암세포주인 MDA-MB-231 세포나 타목시펜 내성 유방암세포주인 TamR-MCF-7 세포의 세포성장을 억제하였다 (Figure 7B 및 C). MBX-2982가 MCF-7 세포주기에 영향을 미치는지 알기 위해서 Propidium iodide를 이용하여 세포주기분석을 수행하였다. MBX-2982 단독처리에 의해서 특정한 세포주기에 MCF-7 세포가 축적되는 현상이나, p53이나 p21과 같은 cyclin-dependent kinase inhibitor protein의 발현변화는 관찰되지 않았다(Figure 7D 및 E). 그럼에도 불구하고, 제피티닙 단독처리에 비해 MBX-2982/제피티닙 병용처리한 MCF-7 세포에서 자가사멸 지표인 annexin v-형광표지 세포, 활성caspase-3 발현 및 cleaved PARP 발현이 증가하였다 (Figure 7F, G 및 H).



**Figure 7. Enhanced proliferation inhibition by GPR119 agonists.**

(A) Effect of GPR119 ligand on cell proliferation of MCF-7 cells. Cell proliferation of MCF-7 cells was monitored after treatments with gefitinib or gefitinib with GPR119 ligands. Relative proliferation rate was calculated by Incucyte® ZOOM basic analyzer. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\* $p$  < 0.05, \*\*\*  $p$  < 0.005, significant difference versus control group, ## $p$  < 0.01,

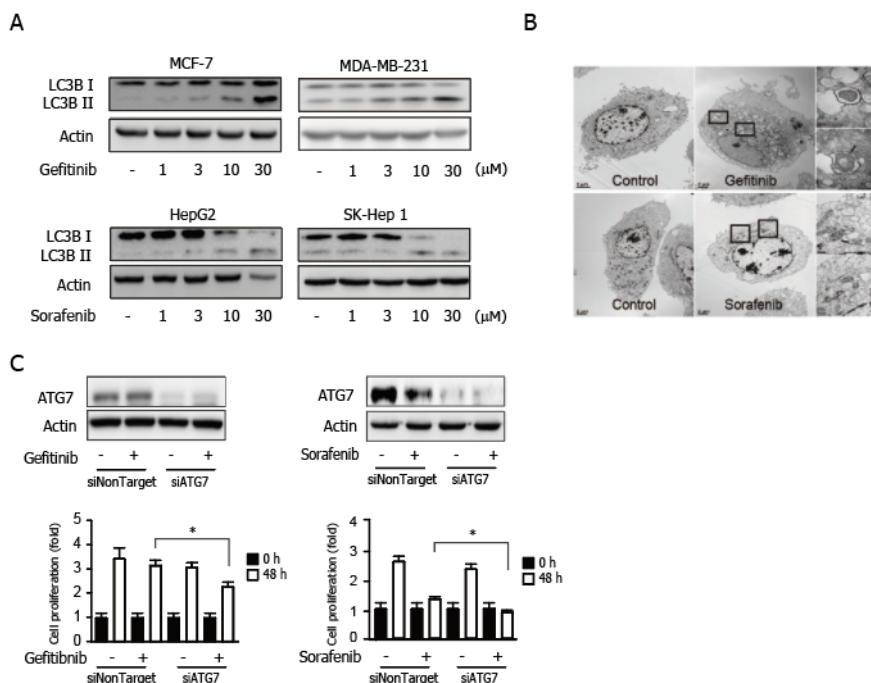
significant difference versus gefitinib-treated group). (B and C) Effect of MBX-2982 on cell proliferation of breast cancer cells. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\* $p$  <0.05, significant difference versus control group, \*\*\* $p$  <0.005, significant difference versus control group) (D and E) Cell cycle analysis and cell cycle-associated protein expression. MCF-7 cells were treated with MBX-2982 (MBX) for 24 h and fixed with ethanol. Cell cycle was analyzed by PI staining in MCF-7 cells. (F) Apoptosis induction by gefitinib with MBX-2982. Apoptosis was determined by PI and annexin V staining. The stained cells were analyzed by flow cytometry in MCF-7 cells. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\*\*  $p$  <0.01, significant difference versus control group) (G) Caspase3/7 activity. MCF-7 cells were preincubated with DEVD-NucView™ 488, and exposed to gefitinib and MBX-2982 for 60 h, and caspase-3/7-selective green fluorescence was monitored. Green fluorescence intensity was calculated by Incucyte® ZOOM basic analyzer. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\*\*\* $p$  <0.005, significant difference versus control group) (H) PARP cleavage by gefitinib with MBX-2982. MCF-7 cells were incubated in the presence of gefitinib or

gefitinib with MBX-2982 for 48 h. Western blot analyses were performed to determine PARP cleavage.

## 8) 유방암세포에서 자식작용 촉진 및 제피티닙 내성발현

암세포에 방사선치료를 하거나 항암제 치료를 하는 경우 자식작용이 활성화됨이 알려져 있다[29, 30]. 이때 자식작용은 암세포를 사멸시키기도 하지만 세포스트레스를 완화시켜서 생존에 도움이 되기도 한다. MCF-7 및 MDA-MB-231 유방암세포에 제피티닙을 처리하였을 때 LC3B II 증가하는 것을 통해서 세포자식작용이 증가함을 관찰하였다 (Figure 8A, 위). HepG2 및 SK-Hep-1 간암세포주에 소라페닙 (Nexavar®, 다중인산화효소억제제이며 간암치료제)을 처리하였을 때 역시 세포자식작용이 증가하였다 (Figure 8A, 아래). 전자현미경으로 세포소기관 분석을 수행하였을 때 제피티닙을 처리한 MCF-7 세포 및 소라페닙을 처리한 HepG2 세포에서 오토파고솜 형성을 확인하였다 (Figure 8B). 이때 자식작용이 암세포의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해서 siRNA를 도입하여 ATG7 발현을 억제하여 자식작용을 기능적으로 억제시켰다. Atg7 발현을 억제시킨 경우 대조군에 비해 MCF-7 세포의 성장이 유의적으로 감소하였다(Figure 8C). 이러한 결과는 항암제를 처리한 암세포에서 자식작용이 활성화되어 항암제 내성을 유도함을 입증한다.





**Figure 8. Autophagy protects cancer cells against gefitinib treatments.**

(A) Autophagy induction by gefitinib or sorafenib in human breast cancer and hepatoma cells. LC3B I/II were measured by immunoblottings in breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231 cells) and hepatocellular carcinoma cells (HepG2 and SK-Hep1 cells). All the cell types were incubated with 1–30  $\mu$ M gefitinib for 24 h or 1–30  $\mu$ M sorafenib for 18 h. (B) Autophagosome formations in gefitinib-treated MCF-7 and sorafenib-treated HepG2 cells. Autophagosome formation was

visualized by TEM in MCF-7 and HepG2 cells. Both the cell types were incubated with 10  $\mu$ M gefitinib or 10  $\mu$ M sorafenib for 24 h. Arrows indicate double lipid layer vesicle structures. (C) Effect of ATG7 siRNA on anti-proliferative effect of gefitinib or sorafenib. ATG7 expression was detected by western blotting after siATG7 transfection (upper) and cell proliferation was monitored by Incucyte® ZOOM basic analyzer in MCF-7 and HepG2 cells (lower). Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=6) (\*  $p$  <0.05, significant difference between the indicated two groups).

## 9) GPR119 리간드의 자식작용 억제효과

MCF-7 세포에 MBX-2982 를 처리하였을 때 제피티닙 처리로 유도된 LC3B II 의 생성이 감소하였으며(Figure 9A), 또다른 GPR119 리간드인 GSK1292263 역시 제피티닙 처리로 유도된 LC3B II 의 생성을 억제하였다(Figure 9B). 클로로퀸은 라이소좀의 기능을 저해시키고오토라이소좀(autolysosome)형성을 억제하여 오토파고솜 축적을 유도한다[31]. MBX-2982 을 처리하였을 때 MCF-7 세포에서 클로로퀸으로 유도된 LC3B II 생성이 감소하였다(Figure 9C). LC3-GFP 플라스미드를 세포에 도입시키면 오토파고솜이 생성되었을 때 녹색형광 puncta 로 가시화된다. 제피티닙을 처리하였을 때 MCF-7 세포에서 녹색형광 puncta 생성이 증가하였고 MBX-2982 를 동시처리 하였을 때 생성이 감소하였다(Figure 9D). 상기 결과를 종합하면, MBX-2982 는 MCF-7 세포에서 제피티닙 처리로 유도된 자식작용을 억제함을 알 수 있다. 더 나아가, 누드마우스에 MCF-7 세포를 이식하고 생체활성을 평가하였다. 제피티닙 혹은 MBX-2982 단독투여군에서 암성장억제가 관찰되지 않았으나 제피티닙과 MBX-2982 를 동시투여한 군에서 유의적으로 암성장이 억제되었다(Figure 9E). HepG2-X 를 이식한 누드마우스에 소라페닙과 MBX-2982 를

투여하였을 때 각각 단독투여한 군에 비해 암세포성장이 억제되었다 (Figure 9F).

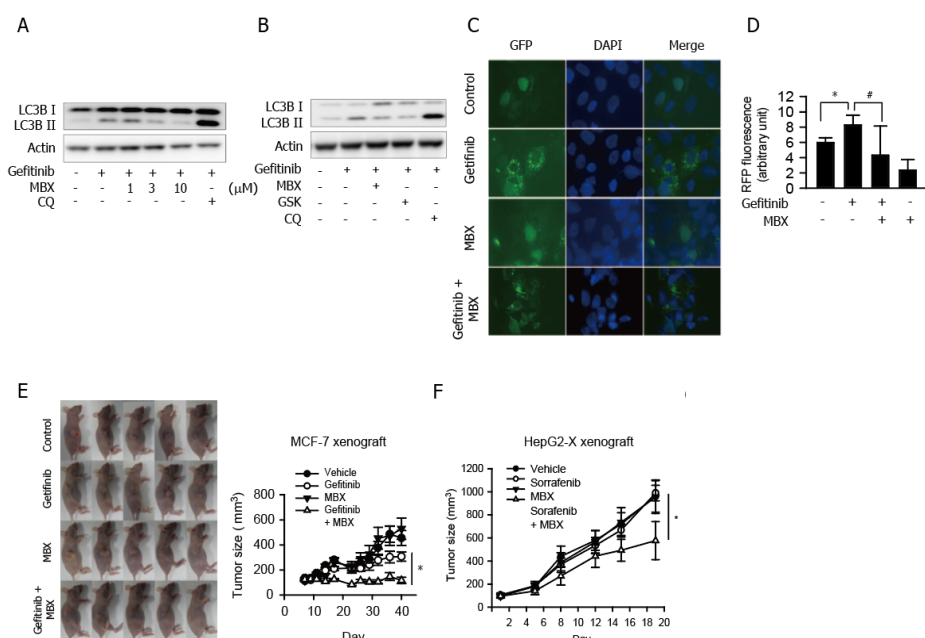


Figure 9. Inhibition of gefitinib-induced autophagy by GPR119 ligand *in vitro* and *in vivo*

(A) Inhibition of gefitinib-induced autophagy formation by MBX-2982. LC3B I/II were measured by western blotting in MCF-7 cells (B) Inhibition of gefitinib-induced autophagy formation by GSK1292263. LC3B I/II were measured by western blotting in MCF-7 cells (C and D) Inhibition of autophagosome puncture formation by MBX-2982. Green fluorescence puncta were detected by fluorescence microscopy after LC3-GFP transfection in MCF-7 cells. Red fluorescence was calculated in MCF-7 cells

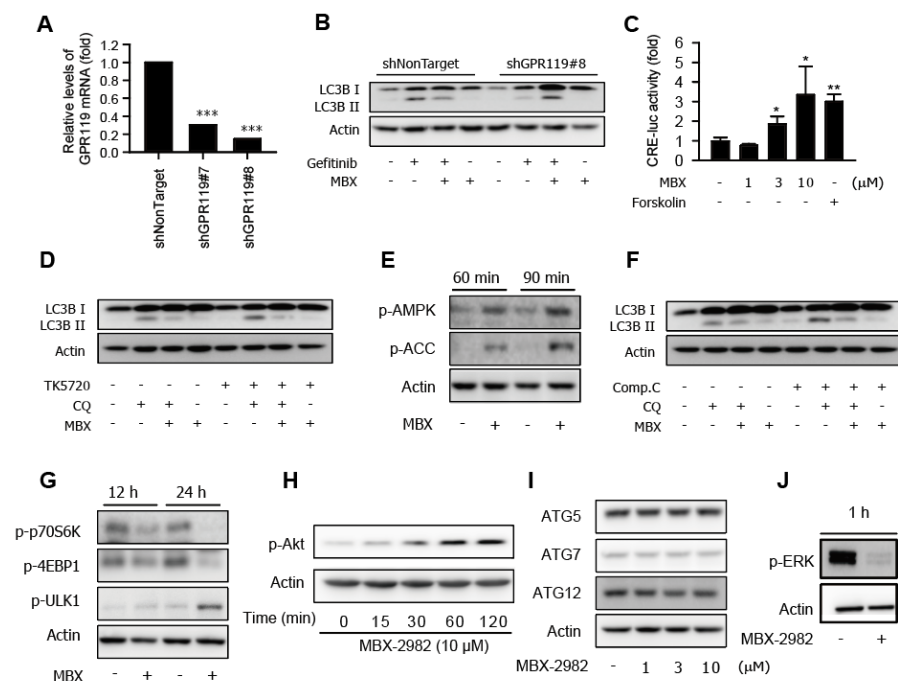
after mCherry-GFP-LC3 plasmid transfection. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\* $p$  < 0.05, significant difference between the indicated two groups, # $p$  < 0.05, significant difference versus gefitinib-treated group). (E) Xenograft analysis. Tumor growth of MCF-7 xenograft was monitored for 40 days. Balb/c-nu mice were orally administered with gefitinib (10 mg/kg), MBX-2982 (10 mg/kg) or gefitinib with MBX-2982 (5 times a week). Data represent the mean  $\pm$  S.E. (n=5) (\*  $p$  < 0.05, significant difference between the indicated two groups). (F) HepG2-X xenograft. Sorafenib (10 mg/kg), MBX-2982 (10 mg/kg) or Sorafenib with MBX-2982 were orally administered (5 times a week) and tumor growth was monitored for 18 days. Data represent the mean  $\pm$  S.E. (n=6) (\* $p$  < .05, significant difference versus vehicle-treated control group).

## 10) GPR119 리간드와 자식작용 대표조절신호

MBX-2982 의 자식작용억제효과가 GPR119 수용체를 경유하는지 알기 위해서 MCF-7 세포에 shGPR119 lentivirus 를 감염시켜서 수용체를 결손시켰다 (Figure 10B). 대조군에서 보인 MBX-2982 의 자식작용억제효과는 GPR119 수용체 결손 MCF-7 세포에서 관찰되지 않았다(Figure 10C). 따라서 MBX-2982 의 자식작용억제효과는 GPR119 수용체 의존적이라고 할 수 있다. 기존에 알려진 바에 의하면 GPR119 수용체는 Gas 를 경유하여 세포내 PKA 활성화/cAMP 증가를 매개한다. 세포내 cAMP 는 cAMP-response element(CRE) 활성을 증가시키므로 CRE-luciferase 활성을 측정하여 cAMP 증가를 간접적으로 평가할 수 있다. MCF-7 세포에서 MBX-2982 를 처리하였을 때 CRE-luciferase 활성이 증가하였다. 하지만 PKA 억제제를 처리하여 PKA/cAMP 경로를 차단하였을 때 MBX-2982 의 자식작용억제효과는 반전되지 않았으며, AMPK 신호를 차단하였을 때도 자식작용반전은 일어나지 않았다 (Figure 10D, E 및 F). 자식작용을 제어하는 대표적인 신호인 mTORC 의 활성은 MBX-2982 에 의해서 감소하였다(Figure 10G). 다만, MBX-2982 처리 1 시간 경과 후 Akt 인산화증가로 볼 때, mTORC2 가 보상적 활성화될 가능성이 있으며(Figure 10H), ERK 인산화가 감소한 것은

미토콘드리아 에너지 활성 감소신호로 작용할 수 있다 (Figure 10J).  
MBX-2982 처리는 오토파고솜을 생성하는 집합체구성인 ATG5,  
ATG7 및 ATG12의 발현에 영향을 주지 않았다(Figure 10I).





**Figure 10. No involvement of Gas or mTOR signaling in autophagy inhibition by MBX-2982.**

(A) GPR119 mRNA expression in GPR119 shRNA-infected cells. MCF-7 cells were infected with shGPR119 or shNonTarget lentivirus particle, and GPR119 mRNA expression was determined by real-time qPCR. Data represent the mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ) (\*\*\*)  $p < 0.005$ , significant difference versus shNonTarget-infected control). (B) Reversal of MBX-2982-induced autophagy inhibition in GPR119 knock-down cells. LC3B I/II were measured

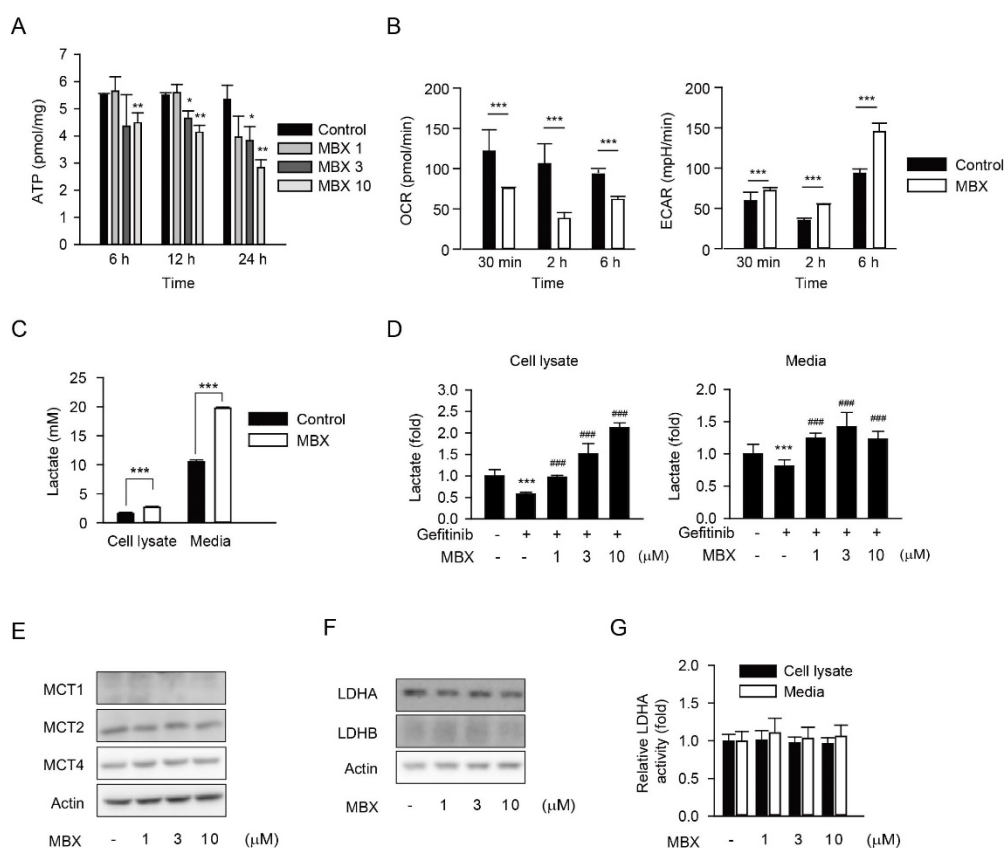
by western blotting in shGPR119 or shNonTarget-infected MCF-7 cells. (C) CRE reporter activity. MCF-7 cells were transiently transfected with CRE-luciferase reporter plasmid (CRE-luc) and its reporter activity was measured using luminometer. MCF-7 cells were treated with 3  $\mu$ M forskolin as positive control. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, significant difference versus control group). (D) Effect of PKA inhibitor on autophagy inhibition by MBX-2982. MCF-7 cells were preincubated with 10  $\mu$ M of TK5720, a PKA inhibitor for 30 min and then treated with 3  $\mu$ M chloroquine in the presence or absence of 10  $\mu$ M MBX-2982. (E) AMPK activation by MBX-2982. AMPK activity was determined by immunoblottings for phosphorylated AMPK and phosphorylated ACC proteins in MCF-7 cells treated with 10  $\mu$ M MBX-2982. (F) Effect of AMPK inhibitor on autophagy inhibition by MBX-2982. MCF-7 cells were preincubated with 3  $\mu$ M compound C, an AMPK inhibitor for 30 min and then treated with 3  $\mu$ M chloroquine in the presence or absence of 10  $\mu$ M MBX-2982. (G) Effect of MBX-2982 on mTOR signaling pathway. mTOR signaling pathway was determined by immunoblottings for phosphorylated p70S6 kinase,

phosphorylated 4EBP1 and phosphorylated ULK1 proteins in MCF-7 cells treated with 10  $\mu$ M MBX-2982. (H) AKT activation by MBX-2982. (I) Effects of MBX-2982 on the protein levels of ATG5, ATG7 and ATG12. MCF-7 cells were treated with MBX-2982 (1-10  $\mu$ M) for 24 h (J) ERK suppression by MBX-2982.

## 11) GPR119 리간드가 암세포대사에 미치는 영향

GPR119 리간드가 대사질환치료제로 개발된 것에 착안하여 암세포대사에 영향을 줄 것이라고 가설을 세우고, MBX-2982 를 처리한 MCF-7 세포에서 대사체 분석을 수행하였다(결과미첨부). 많은 대사체의 유의적인 변화가 관찰되었으며 특히 ATP 의 상당한 감소가 확인되었다. 암세포대사는 해당(glycolysis)과 산화적인산화(Oxidative phosphorylation)를 통해서 ATP 에너지와 영양소를 공급하는데 빠른 성장속도 때문에 많은 에너지와 영양소가 요구된다. 따라서, 암세포대사는 정상세포와 다른 비정상적인 세포대사를 유지하고 세포에너지를 공급한다[32]. MBX-2982 를 처리하였을 때 MCF-7 세포에서 지속적이며 농도 의존적으로 세포내 ATP 가 감소하였다(Figure 11A). 세포대사측정기로 MBX-2982 를 처리한 MCF-7 세포에서 OXPHOS 지표(Oxidative phosphorylation rate, OCR)의 감소 및 해당지표(Extracellular acidification rate, ECAR)의 증가를 관찰하였다(Figure 11B). 해당과정에서 생성되는 젖산이 MBX-2982 를 처리한 MCF-7 세포 및 배양배지에서 유의적으로 증가하였다 (Figure 11C). 젖산은 세포막의 Monocarboxylate transporter (MCT) 패밀리에 의해서 수송된다 [33, 34]. MBX-2982 를 처리한 MCF-7 세포에서 젖산의 유입수송체인 MCT1 과 MCT2 발현이나 유출수송체인 MCT4

발현변화는 관찰되지 않았다(Figure 11E). MBX-2982 를 처리한 MCF-7 세포에서, 젖산생성효소인 Lactate dehydrogenase (LDH)A 나 젖산제거효소인 LDHB 의 발현변화는 관찰되지 않았으며(Figure 11F), LDHA 효소활성의 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Figure 11G).



**Figure 11. Decrease in cellular ATP content and increase in lactate production by MBX-2982 in MCF-7 cells.**

(A) Cellular ATP content. Total ATP content was determined by ATP assay kit in MCF-7 cells. Cells were treated with MBX-2982 (1–10  $\mu$ M) and harvested at 6, 12 and 24 h. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\* $p$  <0.05, \*\* $p$  <0.01, significant difference versus control group). (B) Effects of MBX-2982 on mitochondrial OXPHOS and glycolysis in MCF-7 cells. MCF-7

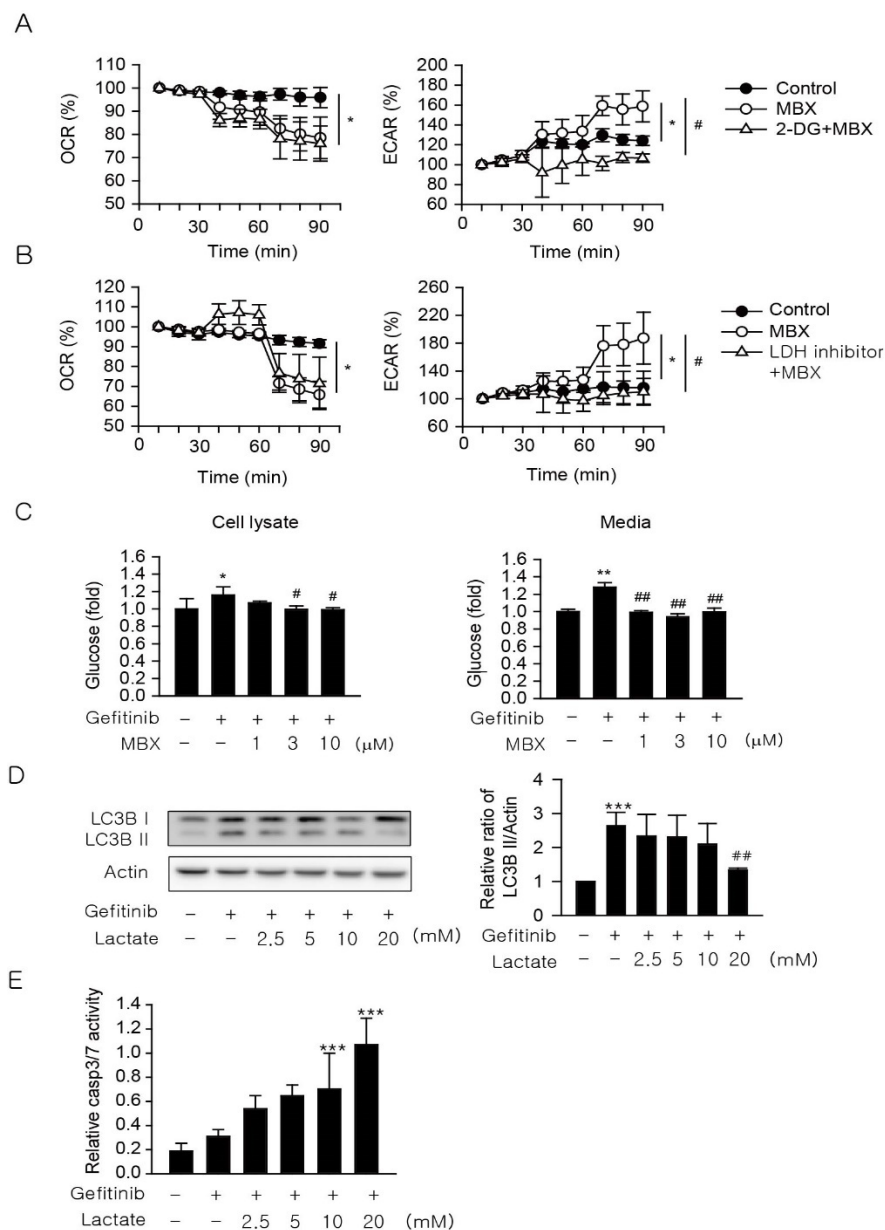
cells were treated with MBX for 30 min, 2 h or 6 h, and OCR and ECAR were determined by XFp analyzer. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\*\* $p$  <0.005, significant difference between the indicated two groups). (C and D) Lactate production by MBX-2982. Lactate concentration was assessed by  $^1\text{H}$ -NMR in MCF-7 cell lysates and culture media. (C) MCF-7 cells were incubated with 10  $\mu\text{M}$  MBX-2982 for 24 h. (D) MCF-7 cells were treated with 10  $\mu\text{M}$  gefitinib in the presence or absence of MBX-2982 (1–10  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\*\* $p$  <0.005, significant difference versus control group, ### $p$  <0.005 significant difference versus gefitinib-treated group). (E) Effects of MBX-2982 on lactate transporter expression. MCF-7 cells were treated with MBX-2982 for 24 h and protein expression of lactate transporters (MCT1, MCT2 and MCT4) was determined by western blottings. (F) Effects of MBX-2982 on the expression of lactate converting enzymes. MCF-7 cells were treated with MBX-2982 for 24 h and protein expression of lactate converting enzymes (LDHA, lactate producing enzyme and LDHB, pyruvate producing enzyme) was determined by western blottings. (G) LDHA enzyme activity. MCF-7 cells were treated with MBX-

2982 for 24 h and LDHA activity was determined by LDH assay kit in cell lysates and culture media. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3).



## 12) GPR119리간드에 의해 증가한 젖산과 자식작용억제효과

산화적인산화 및 해당대사는 상호 밀접하게 작용하는 것으로 알려져 있지만, 구체적인 작용기전은 아직 자세히 알려지지 않았다 [35-37]. GPR119 리간드에 의한 산화적인산화 감소와 해당대사 증가의 기전을 규명하기 위해서, 해당대사를 억제해 보았다. MCF-7 세포에서 해당과정의 억제제인 2-DG 및 LDH억제제를 전처리 하였을 때, MBX-2982에 의해 증가한 ECAR는 원래수준으로 회복되었지만, OCR 반전은 관찰되지 않았다(Figure 12A and 12B). 나아가, MCF-7 세포분획 및 배양배지에서 글루코스 농도를 측정하였을 때, 제피티닙은 글루코스를 증가시켰으며 MBX-2982를 함께 처리하였을 때 다시 감소하였다 (Figure 12C). 면밀한 조사가 더 필요하지만, 아마도 이러한 결과는 제피티닙을 처리한 세포는 성장이 억제되어 글루코스 사용이 감소하지만, MBX-2982는 해당대사를 증가시켜 글루코스 소모를 증가시킴을 추측하게 한다. 핵자기공명분석 결과에서 얻은 젖산의 농도를 기준으로 하여, MCF-7 세포에 제피티닙과 2.5-20 mM 젖산을 처리하였을 때, LC3B II 발현이 감소하였고, cleaved caspase-3/7 활성이 증가하였다(Figure 12D 및 E). 이상의 결과는 MBX-2982에 의해 해당대사가 활성화되어 젖산의 과다 축적이 일어나며 20 mM 이상수준에 도달한 경우 암세포생존에 필수적인 자식작용을 억제하고 항암제 감수성이 증가함을 의미한다.



**Figure 12. Autophagy inhibition via glycolysis-mediated excessive lactate production.**

(A and B) OCR and ECAR were measured by XFp analyzer in

MCF-7 cells. (A) Effect of glycolysis inhibitor on OCR and ECAR in MBX-2982-treated MCF-7 cells. MCF-7 cells were pretreated with or without 2-deoxyglucose (2-DG, 50 mM) for 30 min and incubated with 10  $\mu$ M MBX-2982 for the indicated time. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\* $p$  < 0.05, significant difference between control and MBX-2982 treated group, # $p$  < 0.05, significant difference between MBX-2982 treated group and 2-DG pretreated group). (B) Effect of LDH inhibitor on OCR and ECAR in MBX-2982-treated MCF-7 cells. MCF-7 cells were pretreated with or without GSK2837808 (LDH inhibitor, 10  $\mu$ M) for 30 min and incubated with 10  $\mu$ M MBX-2982. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\* $p$  < 0.05, significant difference between control and MBX-2982 treated group, # $p$  < 0.05, significant difference between MBX-2982 treated group and GSK2837808 pretreated group). (C) Glucose change by MBX-2982. Concentration of glucose was measured by  $^1\text{H}$ -NMR in cell lysates and culture media. MCF-7 cells were treated with 10  $\mu$ M gefitinib in the presence or absence of MBX-2982 for 24 h. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 significant difference versus control group, # $p$  < 0.05, ## $p$  < 0.01

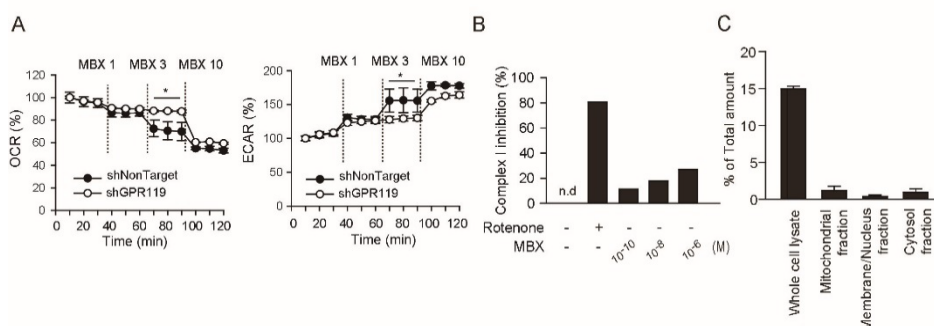
significant difference versus gefitinib-treated group). (D)

Inhibition of gefitinib-induced autophagy by lactate. MCF-7 cells were treated with 10  $\mu$ M gefitinib in the presence or absence of lactate (2.5–20 mM) for 24 h, and LC3B I/II were measured by immunoblottings. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\*\* $p$  <0.005, significant difference versus control group; ## $p$  <0.01, significant difference versus gefitinib-treated group). (E)

Caspase3/7 activation by gefitinib with lactate. MCF-7 cells were treated gefitinib (10  $\mu$ M) with or without lactate (5–20 mM) for 72 h. Caspase-3/7 selective green fluorescence intensity was calculated by Incucyte® ZOOM basic analyzer as described in the legend of Fig. 2E. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n=3) (\*\* $p$  <0.005 significant difference versus gefitinib-treated group).

### 13) GPR119 리간드와 미토콘드리아 기능감소

MBX-2982 에 의한 OCR 감소가 GPR119 수용체를 경유하는 것인지 확인하기 위해서 GPR119 결손세포주에서 ECAR 을 측정하였다. MBX-2982 에 의한 OCR 감소는 처리농도에 따라서 다른 영향을 보였다. 3  $\mu$ M MBX-2982 처리에서 OCR 감소가 회복되었지만 10  $\mu$ M 에서는 여전히 OCR 감소가 관찰되었다 (Figure 13A). 추가적으로, MBX-2982 가 미토콘드리아 산화적인산화 구성인자에 직접 물리적인 작용을 하는지 평가하였다. 소에서 분리한 미토콘드리아를 사용하여 OXPHOS complex I 과 MBX-2982 를 직접 결합반응을 진행하였을때, MBX-2982 1  $\mu$ M 에서 complex I 활성을 20%가량 억제하였다 (Figure 13 B). 나아가, MCF-7 세포에 MBX-2982 를 처리하고 미토콘드리아 분획을 분리하여 MBX-2982 를 정량하였을 때, 처리한 총 량 대비 6.6%가 검출되었다 (Figure 13C).



**Figure 13. Mitochondrial distribution of MBX-2982 and complex I inhibition.**

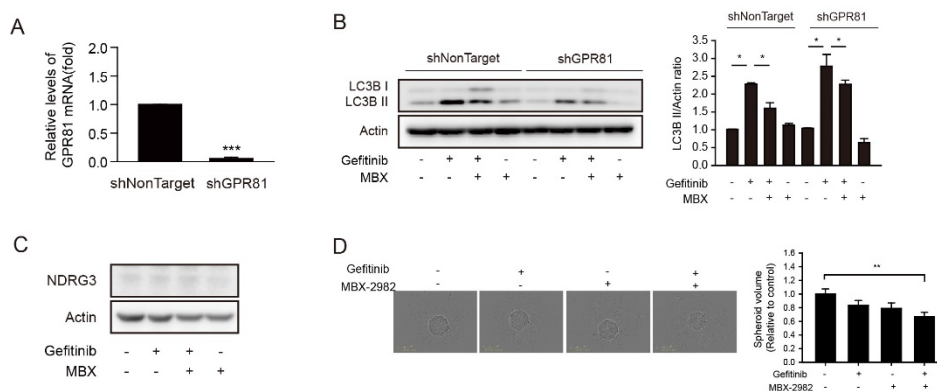
(A) GPR119-independent inhibition of OCR by 10  $\mu$ M MBX-2982. OCR and ECAR were measured by XFp analyzer in both non-target shRNA- or GPR119 shRNA-infected MCF-7 cells. Both the cell types were treated with MBX-2982 (1–10  $\mu$ M).

(B) Mitochondrial complex I inhibition by MBX-2982. Complex I inhibition by MBX-2982 (10<sup>-10</sup>, 10<sup>-8</sup> and 10<sup>-6</sup> M) was tested by mitostress test kit. Rotenone (100 nM) was used as a positive control of complex I inhibition.

(C) Relative amounts of MBX-2982 were determined by LC/Ms/Ms. MCF-7 cells were incubated with MBX-2982 (10  $\mu$ M) for 6 h and then homogenized. Cellular component fraction was isolated by sucrose gradient method.

#### 14) 기존 젓산수용체와 무관한 GPR119 리간드의 자식작용 억제효과

최근의 연구에서 젓산수용체로 GPR81 및 NDRG3 가 보고되었으며, 암세포의 악성화에 기여한다고 연구되었다 [38-40]. 이들과 GPR119 리간드의 상호작용을 연구하기 위해서 Lenti-virus 를 이용하여 GPR81 결손 MCF-7 세포를 구축하였다(Figure 14A). 하지만, GPR81 결손 MCF-7 세포에서 MBX-2982 의 자식작용억제효과는 반전되지 않았다(Figure 14B). 제피티닙이나 MBX-2982 를 단독 혹은 병용처리한 MCF-7 세포에서 NDRG3 발현의 변화는 관찰되지 않았다. 마지막으로 MBX-2982 를 처리한 MCF-7 세포의 3D spheroid 생성을 평가하였을 때, 대조군에 비해 감소하였다(Figure 14C).



**Figure 14. Roles of GPR81 and NDRG3 in autophagy inhibition by MBX-2982.**

(A) GPR81 mRNA expression in GPR81 shRNA-infected cells. MCF-7 cells were infected with shGPR81 or shNonTarget lentivirus particle, and GPR81 mRNA expression was determined by real-time qPCR. (B) Effect of GPR81 shRNA on autophagy inhibition by MBX-2982. (C) MCF-7 cells were treated with 10  $\mu$ M gefitinib in the presence or absence of 10  $\mu$ M MBX-2982 for 24 h, and protein level of NDRG3 was monitored by immunoblotting. (D) Spheroid formation assay.  $10^3$  MCF-7 cells were incubated with indicated compounds for 96 h on ULA plate. Left, Representative images of obtained using Incucyte Zoom system. Right, quantification of tumor spheroid. Data represent



the mean  $\pm$  S.D. (n=3) \* $p < 0.05$ \*\*,  $p < 0.01$ , significant difference between the indicated two groups.

## IV. 고 찰

폐암은 국내, 외 암 발생을 1위이며 5년생존율은 10% 내외이다[41]. 폐암은 소세포폐암과 비소세포폐암으로 구분되며 암의 발생, 진행 및 예후가 다르므로 치료법을 달리하며 비소세포폐암의 경우 전체 폐암의 85%를 차지한다[42]. 비소세포성 폐암의 70 %에서 EGFR 과발현이 보고되었으며 EGFR 표적항암제 연구가 진행되었다. 일반 폐암환자를 대상으로 한 임상 3상에서 낮은 부작용과 40 % 치료효과를 나타냈음에도 불구하고, 실제로는 기존 항암제와 복합요법에 실패하고 생존연장효과가 미비하였다[43, 44]. 이후, 약물과 암환자의 반응성이 전략적으로 분석되었으며, 후속세대 약물개발이나 병용복합제 개발 등이 주도적으로 이루어 지고 있다. 이러한 EGFR 표적항암제의 개발과정은 표적항암제의 활용방안을 극대화시킨 모범사례라고 평가되며 다른 계열의 표적항암제 개발에서도 모방할 만하다.

본 연구에서는 1세대 EGFR 인산화효소억제제인 제피티닙의 내성을 보이는 폐암과 유방암에서 내성기전을 연구하고 대안을 제시하였다. 우선, 제피티닙에 장기간 노출되어 감수성이 사라진 폐암세포주를 구축하였으며, 이들 항암제 획득 내성 폐암세포에서 광범위한 형질전환이 유도됨을 확인하였다. 실제로 항암제를 장기간 투여받은

환자에서 관해 유지 후 암이 재발하는 경우 기존 암과 다른 반응성을 가지는 것이 일반적이며 이와 관련하여 다양한 가설이 제안되었다. 그 중에서 암이 ‘다양한 형질의 암세포들의 집합체’임을 고려하면 암줄기세포이론의 개연성이 높다[45, 46]. 암줄기세포의 기원이나 유지기전은 아직 베일에 쌓여 있지만 앞으로 더 논의가 활발해질 것으로 예상된다. 또 다른 가능성은 유전자손상과 수복기전의 변화이다. 흥미롭게도 HGG827-GR 세포의 EGFR 유전자는 재 돌연변이가 발생한 것이 관찰되었는데, 이러한 결과는 항암제에 노출된 암세포에서 유전자 손상이 유도되고 복구되는 과정에서 항암제 내성을 가지는 암세포가 선별적으로 살아남게 됨을 의미한다 [47, 48].

PLK1은 세포주기조절에서 중요하지만 최근에 암의 발생 및 성장에서 활발히 연구되고 있다. 특히 전립선암이나 유방암, 혈액암에서 암전이를 촉진하고 항암제 내성을 유도하는 것으로 보고되었다 [49-51]. PLK1은 다양한 전사인자를 인산화하고 전사활성을 증가시키기 때문에 PLK1의 발현증가는 비정상적 세포증식을 유발하며 PLK1 선택적억제제인 BI6727(volasertib)이나 BI2536에 대한 활발한 임상시험이 진행중이다. FoxM1은 폐암, 간암, 유방암 등에서 암 발생, 전이, 항암제 내성에 관여한다고 보고되었다 [52]. FoxM1의 DNA binding motif (TAAACA)가 알려져 있으며 FDI-6 및 Siomycin은 FoxM1 전사를 억제한다[53, 54]. FoxM1은 다른 전사

인자와 상호작용하여 DNA 전사를 조절하기도 한다. FoxO3a 등 Fox family 뿐만 아니라 ERα 등 호르몬수용체와의 상호작용이 보고되었다. PLK1은 이미 많은 암종에서 oncogene으로 기능하는 것이 보고되었다. 본 연구에서는 PLK1/FoxM1을 제피티닙 획득 내성 폐암의 치료표적으로 제시하였다. FoxM1의 발현이 제피티닙 반응성에 미치는 영향을 보였으며 BI2536 처리시 FoxM1의 발현감소와 암세포 전이를 억제함을 보였다. BI2536은 PLK1에 의한 FoxM1 전사활성을 억제하여 암줄기세포를 억제하여 항암효과를 나타냈지만 또 다른 기전이 관여할 가능성이 있다. 최근에는 다양한 non-coding RNA가 암의 발생 및 전이에 관여함이 보고되었으며 상피간엽전환이나 암줄기세포 활성화조절에서 기능하는 것이 알려졌다[55-57]. 이러한 non-coding RNA는 특히 전사인자와 유전자결합에 작용하기 때문에 FoxM1과 연계할 개연성이 충분하다.

암세포대사는 와버그효과-호기성해당대사-로 대표된다[58-61]. 하지만 후속연구들에 따르면 다양한 형태의 암세포대사가 가능하며 산화적인산화 및 해당대사의 밀접한 상호연계가 핵심으로 보인다. 암을 비롯한 다양한 질환에서 대사학의 중요성이 높아지고 있지만 연구기법이나 분석법이 어렵기 때문에 많은 연구가 필요하며 신약개발의 가능성이 높은 분야이다. 특히, 당뇨치료제등 대사질환치료제를 신규 항암치료제로 개발하려는 연구가 활발하다. 메트포민이 대

표적인 예이며 기존에 이미 안전성자료가 확립되었기 때문에 신약개발과정의 장점이 있다[62-64]. 유방암은 호르몬에 의존적인 치료요법이 중요하지만 EGFR 표적치료제에 대한 연구도 활발하다[65, 66]. 본 연구에서는 제피티닙 내성을 보이는 유방암에서 GPR119 리간드를 활용하여 제피티닙 감수성을 증가시키는 방안을 제안하였다. MCF-7에서 제피티닙을 처리하였을 때 자식작용이 촉진되어 내성이 나타나지만 GPR119리간드/제피티닙 병용시 자식작용을 억제하고 세포자가사멸이 활성화되었다. 자식작용은 암발생이나 전이과정에서 상반되는 기능을 하는 것으로 연구되었으며 자식작용억제제 항암효과에 논란의 여지가 있다[67, 68]. 호르몬요법제 내성을 보이는 MDA-MB-231 세포나 TamR-MCF-7세포에서 MBX-2982는 단독으로 세포성장억제효과를 보였으며 이는 악성암에서 자식작용억제가 항암효과를 가지는 것과 일치한다. 항암제 내성암이나 전이성 암에서 자식작용은 암세포에 영양을 공급하고 에너지재생을 통해 세포 생존에 기여하는 것이 알려져 있다. 제피티닙 장기처리하여 제피티닙 내성을 획득한 세포에서 자식작용억제제인 클로로퀸, 3-methyladenine이 항암효과를 보인 연구결과가 있으며, 클로로퀸은 암환자를 대상으로 많은 임상시험이 진행중이다[69]. 다른 한편, 암 미세환경에서 자식작용의 기능과 이를 제어하는 치료법에 대한 논의도 진행중이다[70]. 이런 관점에서 GPR119 리간드가 암주변의 섬

유아세포나 면역세포들의 자식작용과 대사에 관한 후속연구도 가치가 있을 법하다.

GPCR의 구조나 정확한 기능은 연구가 더 필요하지만 암연구에서도 흥미로운 결과들이 보고되고 있다. GPR120은 오메가3 지방산에 의해 활성화되고, 전립선 암에서 종양의 진행과 혈관 신생을 촉진하였다. GPR43 및 GPR109A는 결장암세포 증식 억제 및 유방암세포의 종양 형성 억제하였다. GPR40의 내인성 리간드 oleic acid는 유방암세포증식을 촉진하였지만, 합성 리간드 TAK-875는 흑색종 세포증식을 억제하였다. GPR119 리간드에 의한 자가사멸유도 및 자식작용 억제는 고전적인 GRP119 경로 보다는 암세포대사 변화와 관련이 있는 것으로 보인다. MBX-2982에 의한 자식작용 억제는 cAMP/PKA 또는 AMPK 억제로 반전되지 않았다. 반면, 유방암세포에서 MBX-2982를 처리하였을 때 해당대사가 증가하고 그 부산물인 젖산생성이 증가함과 동시에 미토콘드리아 OXPHOS가 감소함을 보였다. 최종적으로 암세포내 ATP 총량은 감소하였으며 증가한 lactate가 자식작용을 억제하였다. 세부기전에 대한 추후 연구가 필요하지만 몇 가지 가능성을 예상해볼 수 있다. 먼저, Lactate에 의한 세포 내 pH 변화와 관련성이다. 오토라이소좀활성은 생리적 산성 pH (> 6.4)에서 활성화된다는 보고가 있지만, GPR119 리간드로 촉진된 급성젖산생산은 오토파고좀형성을 억제하고 암세포사를 유도할

가능성이 있다. 게다가, 젖산수송체나 LDH를 경유한 세포 내 pH 조절은 암세포대사에서 중요한 것으로 보고되었다. 다른 가능성은 젖산수송체의 역할이다. GPR81은 지방세포에서 extracellular 젖산에 의한 지방분해억제효과를 매개한다고 보고되었으며, 악성 종양세포에서 세포이동과 전이에 관여한다고 보고되었다. 하지만 본 연구에서 GPR81 결손 MCF-7 세포주에서 실험하였을 때, MBX-2982에 의한 자식작용억제는 반전되지 않았다. 또한, N-myc downstream-regulated gene 3 (NDRG3)는 암세포내에서 젖산과 결합하고 암세포 성장, 전이를 매개한다고 보고되었다. 하지만 본 연구에서 MBX-2982를 처리한 MCF-7세포에서 NDRG3의 변화는 관찰되지 않았다.

GPR119 리간드가 미토콘드리아에서 산화적인산화를 억제하는 기전은 면밀히 연구되어야 한다. 산화적인산화는  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ , soluble adenylate cyclase등의 조절을 받는다[71-73]. 나아가, MBX-2982가 mTORC 억제한 것으로 볼 때 미토콘드리아 생합성 및 융합 등의 관련성도 배제하기 어렵다[74]. 미토콘드리아 구조나 기능에 대한 연구가 더 진행되면 GPR119 리간드의 활용가치가 더욱 증가하리라 예상된다.

종합적으로, EGFR 표적항암제 내성발현은 상피간엽/암줄기세포전환 및 자식작용이 유도되어 나타나며 PLK1 억제나 GPR119 리간드를 병용하여 감수성을 증가시킬 수 있음을 규명하였다.

## 참고문헌

- [1] A.E. Wakeling, S.P. Guy, J.R. Woodburn, S.E. Ashton, B.J. Curry, A.J. Barker, K.H. Gibson, ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy, *Cancer Res*, 62 (2002) 5749–5754.
- [2] F. Ciardiello, G. Tortora, EGFR antagonists in cancer treatment, *N Engl J Med*, 358 (2008) 1160–1174.
- [3] C.S. Tan, N.B. Kumarakulasinghe, Y.Q. Huang, Y.L.E. Ang, J.R. Choo, B.C. Goh, R.A. Soo, Third generation EGFR TKIs: current data and future directions, *Mol Cancer*, 17 (2018) 29.
- [4] J.K. Rho, Y.J. Choi, S.Y. Kim, T.W. Kim, E.K. Choi, S.J. Yoon, B.M. Park, E. Park, J.H. Bae, C.M. Choi, J.C. Lee, MET and AXL inhibitor NPS-1034 exerts efficacy against lung cancer cells resistant to EGFR kinase inhibitors because of MET or AXL activation, *Cancer Res*, 74 (2014) 253–262.
- [5] J.K. Rho, Y.J. Choi, J.K. Lee, B.Y. Ryoo, Na, II, S.H. Yang, S.S. Lee, C.H. Kim, Y.D. Yoo, J.C. Lee, The role of MET activation in determining the sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, *Mol Cancer Res*, 7 (2009) 1736–1743.
- [6] L.A. Carey, H.S. Rugo, P.K. Marcom, E.L. Mayer, F.J. Esteva, C.X. Ma, M.C. Liu, A.M. Storniolo, M.F. Rimawi, A. Forero-Torres, A.C. Wolff, T.J. Hobday, A. Ivanova, W.K. Chiu, M. Ferraro, E. Burrows, P.S. Bernard, K.A. Hoadley, C.M. Perou, E.P. Winer, TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast



cancer, *J Clin Oncol*, 30 (2012) 2615–2623.

[7] L. Carey, E. Winer, G. Viale, D. Cameron, L. Gianni, Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience?, *Nat Rev Clin Oncol*, 7 (2010) 683–692.

[8] W.L. Tam, R.A. Weinberg, The epigenetics of epithelial–mesenchymal plasticity in cancer, *Nat Med*, 19 (2013) 1438–1449.

[9] A. Eramo, F. Lotti, G. Sette, E. Piloizzi, M. Biffoni, A. Di Virgilio, C. Conticello, L. Ruco, C. Peschle, R. De Maria, Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population, *Cell Death Differ*, 15 (2008) 504–514.

[10] A. Singh, J. Settleman, EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer, *Oncogene*, 29 (2010) 4741–4751.

[11] W.T. Weng Ng, J.S. Shin, T.L. Roberts, B. Wang, C.S. Lee, Molecular interactions of polo-like kinase 1 in human cancers, *J Clin Pathol*, 69 (2016) 557–562.

[12] J. Laoukili, M.R. Kooistra, A. Bras, J. Kauw, R.M. Kerkhoven, A. Morrison, H. Clevers, R.H. Medema, FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability, *Nat Cell Biol*, 7 (2005) 126–136.

[13] Y. Lee, K.H. Kim, D.G. Kim, H.J. Cho, Y. Kim, J. Rheey, K. Shin, Y.J. Seo, Y.S. Choi, J.I. Lee, J. Lee, K.M. Joo, D.H. Nam, FoxM1 Promotes Stemness and Radio-Resistance of Glioblastoma by Regulating the Master Stem Cell Regulator Sox2, *PLoS One*, 10 (2015) e0137703.

[14] I. Wierstra, J. Alves, Cyclin E/Cdk2, P/CAF, and E1A

regulate the transactivation of the c-myc promoter by FOXM1, *Biochem Biophys Res Commun*, 368 (2008) 107–115.

[15] J. Su, S. Wu, H. Wu, L. Li, T. Guo, CD44 is functionally crucial for driving lung cancer stem cells metastasis through Wnt/beta-catenin-FoxM1-Twist signaling, *Mol Carcinog*, 55 (2016) 1962–1973.

[16] R. Mathew, V. Karantza-Wadsworth, E. White, Role of autophagy in cancer, *Nat Rev Cancer*, 7 (2007) 961–967.

[17] N. Gammoh, D. Lam, C. Puente, I. Ganley, P.A. Marks, X. Jiang, Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (2012) 6561–6565.

[18] X. Sui, N. Kong, M. Zhu, X. Wang, F. Lou, W. Han, H. Pan, Cotargeting EGFR and autophagy signaling: A novel therapeutic strategy for non-small-cell lung cancer, *Mol Clin Oncol*, 2 (2014) 8–12.

[19] W.H. Dragowska, S.A. Wepler, J.C. Wang, L.Y. Wong, A.I. Kapanen, J.S. Rawji, C. Warburton, M.A. Qadir, E. Donohue, M. Roberge, S.M. Gorski, K.A. Gelmon, M.B. Bally, Induction of autophagy is an early response to gefitinib and a potential therapeutic target in breast cancer, *PLoS One*, 8 (2013) e76503.

[20] M.C. Fyfe, J.G. McCormack, H.A. Overton, M.J. Procter, C. Reynet, GPR119 agonists as potential new oral agents for the treatment of type 2 diabetes and obesity, *Expert Opin Drug Discov*, 3 (2008) 403–413.

[21] J.W. Yang, H.S. Kim, J.H. Im, J.W. Kim, D.W. Jun, S.C. Lim, K. Lee, J.M. Choi, S.K. Kim, K.W. Kang, GPR119: a promising

target for nonalcoholic fatty liver disease, *FASEB J*, 30 (2016) 324–335.

[22] K. Shien, S. Toyooka, H. Yamamoto, J. Soh, M. Jida, K.L. Thu, S. Hashida, Y. Maki, E. Ichihara, H. Asano, K. Tsukuda, N. Takigawa, K. Kiura, A.F. Gazdar, W.L. Lam, S. Miyoshi, Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell–like properties in cancer cells, *Cancer Res*, 73 (2013) 3051–3061.

[23] T. Nakagawa, S. Takeuchi, T. Yamada, S. Nanjo, D. Ishikawa, T. Sano, K. Kita, T. Nakamura, K. Matsumoto, K. Suda, T. Mitsudomi, Y. Sekido, T. Uenaka, S. Yano, Combined therapy with mutant–selective EGFR inhibitor and Met kinase inhibitor for overcoming erlotinib resistance in EGFR–mutant lung cancer, *Mol Cancer Ther*, 11 (2012) 2149–2157.

[24] S. La Monica, D. Cretella, M. Bonelli, C. Fumarola, A. Cavazzoni, G. Digiaco, L. Flammini, E. Barocelli, R. Minari, N. Naldi, P.G. Petronini, M. Tiseo, R. Alfieri, Trastuzumab emtansine delays and overcomes resistance to the third–generation EGFR–TKI osimertinib in NSCLC EGFR mutated cell lines, *J Exp Clin Cancer Res*, 36 (2017) 174.

[25] I.J. Cho, Y.W. Kim, C.Y. Han, E.H. Kim, R.A. Anderson, Y.S. Lee, C.H. Lee, S.J. Hwang, S.G. Kim, E–cadherin antagonizes transforming growth factor beta1 gene induction in hepatic stellate cells by inhibiting RhoA–dependent Smad3 phosphorylation, *Hepatology*, 52 (2010) 2053–2064.

[26] Y. Wang, W. Zhang, L. Wen, H. Yang, M. Wen, Y. Yun, L. Zhao, X. Zhu, L. Tian, E. Luo, Y. Li, W. Liu, N. Wen, FOXM1 confers

resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma via a MET/AKT-dependent positive feedback loop, *Oncotarget*, 7 (2016) 59245–59259.

[27] P. Savage, A. Blanchet-Cohen, T. Revil, D. Badescu, S.M.I. Saleh, Y.C. Wang, D. Zuo, L. Liu, N.R. Bertos, V. Munoz-Ramos, M. Basik, K. Petrecca, J. Asselah, S. Meterissian, M.C. Guiot, A. Omeroglu, C.L. Kleinman, M. Park, J. Ragoussis, A Targetable EGFR-Dependent Tumor-Initiating Program in Breast Cancer, *Cell Rep*, 21 (2017) 1140–1149.

[28] S.Y. Shin, A.K. Muller, N. Verma, S. Lev, L.K. Nguyen, Systems modelling of the EGFR-PYK2-c-Met interaction network predicts and prioritizes synergistic drug combinations for triple-negative breast cancer, *PLoS Comput Biol*, 14 (2018) e1006192.

[29] P. Wang, J. Zhang, L. Zhang, Z. Zhu, J. Fan, L. Chen, L. Zhuang, J. Luo, H. Chen, L. Liu, Z. Chen, Z. Meng, MicroRNA 23b regulates autophagy associated with radioresistance of pancreatic cancer cells, *Gastroenterology*, 145 (2013) 1133–1143 e1112.

[30] R.K. Amaravadi, D. Yu, J.J. Lum, T. Bui, M.A. Christophorou, G.I. Evan, A. Thomas-Tikhonenko, C.B. Thompson, Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma, *J Clin Invest*, 117 (2007) 326–336.

[31] S. El-Chemaly, A. Taveira-Dasilva, H.J. Goldberg, E. Peters, M. Haughey, D. Bienfang, A.M. Jones, P. Julien-Williams, Y. Cui, J.A. Villalba, S. Bagwe, R. Maurer, I.O. Rosas, J. Moss, E.P. Henske, Sirolimus and Autophagy Inhibition in Lymphangi leiomyomatosis: Results of a Phase I Clinical Trial,

Chest, 151 (2017) 1302–1310.

[32] G.L. Semenza, Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate, *J Clin Invest*, 118 (2008) 3835–3837.

[33] M. Beloueche–Babari, S. Wantuch, T. Casals Galobart, M. Koniordou, H.G. Parkes, V. Arunan, Y.L. Chung, T.R. Eykyn, P.D. Smith, M.O. Leach, MCT1 Inhibitor AZD3965 Increases Mitochondrial Metabolism, Facilitating Combination Therapy and Noninvasive Magnetic Resonance Spectroscopy, *Cancer Res*, 77 (2017) 5913–5924.

[34] K.J. Song, X.N. Yu, T. Lv, Y.L. Chen, Y.C. Diao, S.L. Liu, Y.K. Wang, Q. Yao, Expression and prognostic value of lactate dehydrogenase–A and –D subunits in human uterine myoma and uterine sarcoma, *Medicine (Baltimore)*, 97 (2018) e0268.

[35] H. Cheng, F. Isoda, D.D. Belsham, C.V. Mobbs, Inhibition of agouti–related peptide expression by glucose in a clonal hypothalamic neuronal cell line is mediated by glycolysis, not oxidative phosphorylation, *Endocrinology*, 149 (2008) 703–710.

[36] J.C. Doery, J. Hirsh, I. Cooper, Energy metabolism in human platelets: interrelationship between glycolysis and oxidative metabolism, *Blood*, 36 (1970) 159–168.

[37] F. Malinarich, K. Duan, R.A. Hamid, A. Bijin, W.X. Lin, M. Poidinger, A.M. Fairhurst, J.E. Connolly, High mitochondrial respiration and glycolytic capacity represent a metabolic phenotype of human tolerogenic dendritic cells, *J Immunol*, 194 (2015) 5174–5186.

[38] K. Ahmed, S. Tunaru, S. Offermanns, GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy–carboxylic acid receptors,

Trends Pharmacol Sci, 30 (2009) 557–562.

[39] K.C. Park, D.C. Lee, Y.I. Yeom, NDRG3-mediated lactate signaling in hypoxia, BMB Rep, 48 (2015) 301–302.

[40] W. Wang, Y. Li, Y. Li, A. Hong, J. Wang, B. Lin, R. Li, NDRG3 is an androgen regulated and prostate enriched gene that promotes in vitro and in vivo prostate cancer cell growth, Int J Cancer, 124 (2009) 521–530.

[41] J.C. Soria, Y. Ohe, J. Vansteenkiste, T. Reungwetwattana, B. Chewaskulyong, K.H. Lee, A. Dechaphunkul, F. Imamura, N. Nogami, T. Kurata, I. Okamoto, C. Zhou, B.C. Cho, Y. Cheng, E.K. Cho, P.J. Voon, D. Planchard, W.C. Su, J.E. Gray, S.M. Lee, R. Hodge, M. Marotti, Y. Rukazenzov, S.S. Ramalingam, F. Investigators, Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer, N Engl J Med, 378 (2018) 113–125.

[42] M.M. Fidler, S. Gupta, I. Soerjomataram, J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, F. Bray, Cancer incidence and mortality among young adults aged 20–39 years worldwide in 2012: a population-based study, Lancet Oncol, 18 (2017) 1579–1589.

[43] D. Hong, G. Zhang, X. Zhang, X. Lian, Pulmonary Toxicities of Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, Medicine (Baltimore), 95 (2016) e3008.

[44] W. Zhang, Y. Wei, D. Yu, J. Xu, J. Peng, Gefitinib provides similar effectiveness and improved safety than erlotinib for advanced non-small cell lung cancer: A meta-analysis, Medicine (Baltimore), 97 (2018) e0460.

- [45] M. Jamal–Hanjani, G.A. Wilson, N. McGranahan, N.J. Birkbak, T.B.K. Watkins, S. Veeriah, S. Shafi, D.H. Johnson, R. Mitter, R. Rosenthal, M. Salm, S. Horswell, M. Escudero, N. Matthews, A. Rowan, T. Chambers, D.A. Moore, S. Turajlic, H. Xu, S.M. Lee, M.D. Forster, T. Ahmad, C.T. Hiley, C. Abbosh, M. Falzon, E. Borg, T. Marafioti, D. Lawrence, M. Hayward, S. Kolvekar, N. Panagiotopoulos, S.M. Janes, R. Thakrar, A. Ahmed, F. Blackhall, Y. Summers, R. Shah, L. Joseph, A.M. Quinn, P.A. Crosbie, B. Naidu, G. Middleton, G. Langman, S. Trotter, M. Nicolson, H. Remmen, K. Kerr, M. Chetty, L. Gomersall, D.A. Fennell, A. Nakas, S. Rathinam, G. Anand, S. Khan, P. Russell, V. Ezhil, B. Ismail, M. Irvin–Sellers, V. Prakash, J.F. Lester, M. Kornaszewska, R. Attanoos, H. Adams, H. Davies, S. Dentre, P. Tanriere, B. O'Sullivan, H.L. Lowe, J.A. Hartley, N. Iles, H. Bell, Y. Ngai, J.A. Shaw, J. Herrero, Z. Szallasi, R.F. Schwarz, A. Stewart, S.A. Quezada, J. Le Quesne, P. Van Loo, C. Dive, A. Hackshaw, C. Swanton, T.R. Consortium, Tracking the Evolution of Non–Small–Cell Lung Cancer, *N Engl J Med*, 376 (2017) 2109–2121.
- [46] J.N. Rich, Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity, *Medicine (Baltimore)*, 95 (2016) S2–7.
- [47] W.L. Hu, L. Jin, A. Xu, Y.F. Wang, R.F. Thorne, X.D. Zhang, M. Wu, GUARDIN is a p53–responsive long non–coding RNA that is essential for genomic stability, *Nat Cell Biol*, 20 (2018) 492–502.
- [48] J. Stebbing, K. Shah, L.C. Lit, T. Gagliano, A. Ditsiou, T. Wang, F. Wendler, T. Simon, K.S. Szabo, T. O'Hanlon, M. Dean, A.C. Roslani, S.H. Cheah, S.C. Lee, G. Giamas, LMTK3 confers

chemo-resistance in breast cancer, *Oncogene*, 37 (2018) 3113–3130.

[49] M.D. Wissing, J. Mendonca, M.S. Kortenhorst, N.S. Kaelber, M. Gonzalez, E. Kim, H. Hammers, P.J. van Diest, M.A. Carducci, S.K. Kachhap, Targeting prostate cancer cell lines with polo-like kinase 1 inhibitors as a single agent and in combination with histone deacetylase inhibitors, *FASEB J*, 27 (2013) 4279–4293.

[50] O. Saatci, S. Borgoni, O. Akbulut, S. Durmus, U. Raza, E. Eyupoglu, C. Alkan, A. Akyol, O. Kutuk, S. Wiemann, O. Sahin, Targeting PLK1 overcomes T-DM1 resistance via CDK1-dependent phosphorylation and inactivation of Bcl-2/xL in HER2-positive breast cancer, *Oncogene*, 37 (2018) 2251–2269.

[51] H. Dohner, M. Lubbert, W. Fiedler, L. Fouillard, A. Haaland, J.M. Brandwein, S. Lepretre, O. Reman, P. Turlure, O.G. Ottmann, C. Muller-Tidow, A. Kramer, E. Raffoux, K. Dohner, R.F. Schlenk, F. Voss, T. Taube, H. Fritsch, J. Maertens, Randomized, phase 2 trial of low-dose cytarabine with or without volasertib in AML patients not suitable for induction therapy, *Blood*, 124 (2014) 1426–1433.

[52] P. Raychaudhuri, H.J. Park, FoxM1: a master regulator of tumor metastasis, *Cancer Res*, 71 (2011) 4329–4333.

[53] A.L. Gartel, Thiazole Antibiotics Siomycin a and Thiostrepton Inhibit the Transcriptional Activity of FOXM1, *Front Oncol*, 3 (2013) 150.

[54] M. Youn, N. Wang, C. LaVasseur, E. Bibikova, S. Kam, B. Glader, K.M. Sakamoto, A. Narla, Loss of Forkhead box M1 promotes erythropoiesis through increased proliferation of



- erythroid progenitors, *Haematologica*, 102 (2017) 826–834.
- [55] J. Jen, Y.A. Tang, Y.H. Lu, C.C. Lin, W.W. Lai, Y.C. Wang, Oct4 transcriptionally regulates the expression of long non-coding RNAs NEAT1 and MALAT1 to promote lung cancer progression, *Mol Cancer*, 16 (2017) 104.
- [56] C.C. Sun, S.J. Li, G. Li, R.X. Hua, X.H. Zhou, D.J. Li, Long Intergenic Noncoding RNA 00511 Acts as an Oncogene in Non-small-cell Lung Cancer by Binding to EZH2 and Suppressing p57, *Mol Ther Nucleic Acids*, 5 (2016) e385.
- [57] M.D. Xu, Y. Wang, W. Weng, P. Wei, P. Qi, Q. Zhang, C. Tan, S.J. Ni, L. Dong, Y. Yang, W. Lin, Q. Xu, D. Huang, Z. Huang, Y. Ma, W. Zhang, W. Sheng, X. Du, A Positive Feedback Loop of lncRNA-PVT1 and FOXM1 Facilitates Gastric Cancer Growth and Invasion, *Clin Cancer Res*, 23 (2017) 2071–2080.
- [58] S.M. Kim, S.G. Roy, B. Chen, T.M. Nguyen, R.J. McMonigle, A.N. McCracken, Y. Zhang, S. Kofuji, J. Hou, E. Selwan, B.T. Finicle, T.T. Nguyen, A. Ravi, M.U. Ramirez, T. Wiher, G.G. Guenther, M. Kono, A.T. Sasaki, L.S. Weisman, E.O. Potma, B.J. Tromberg, R.A. Edwards, S. Hanessian, A.L. Edinger, Targeting cancer metabolism by simultaneously disrupting parallel nutrient access pathways, *J Clin Invest*, 126 (2016) 4088–4102.
- [59] S.H. Jiang, J. Li, F.Y. Dong, J.Y. Yang, D.J. Liu, X.M. Yang, Y.H. Wang, M.W. Yang, X.L. Fu, X.X. Zhang, Q. Li, X.F. Pang, Y.M. Huo, J. Li, J.F. Zhang, H.Y. Lee, S.J. Lee, W.X. Qin, J.R. Gu, Y.W. Sun, Z.G. Zhang, Increased Serotonin Signaling Contributes to the Warburg Effect in Pancreatic Tumor Cells Under Metabolic Stress and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice,

Gastroenterology, 153 (2017) 277–291 e219.

[60] C. Li, Z. Zhao, Z. Zhou, R. Liu, PKM2 Promotes Cell Survival and Invasion Under Metabolic Stress by Enhancing Warburg Effect in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, *Dig Dis Sci*, 61 (2016) 767–773.

[61] W. Schneiderhan, M. Scheler, K.H. Holzmann, M. Marx, J.E. Gschwend, M. Bucholz, T.M. Gress, T. Seufferlein, G. Adler, F. Oswald, CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models, *Gut*, 58 (2009) 1391–1398.

[62] D. Henderson, D. Frieson, J. Zuber, S.S. Solomon, Metformin Has Positive Therapeutic Effects in Colon Cancer and Lung Cancer, *Am J Med Sci*, 354 (2017) 246–251.

[63] R.W. Chong, V. Vasudevan, J. Zuber, S.S. Solomon, Metformin Has a Positive Therapeutic Effect on Prostate Cancer in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus, *Am J Med Sci*, 351 (2016) 416–419.

[64] S. Ma, Y. Zheng, Y. Xiao, P. Zhou, H. Tan, Meta-analysis of studies using metformin as a reducer for liver cancer risk in diabetic patients, *Medicine (Baltimore)*, 96 (2017) e6888.

[65] S.Y. Lee, R. Meier, S. Furuta, M.E. Lenburg, P.A. Kenny, R. Xu, M.J. Bissell, FAM83A confers EGFR–TKI resistance in breast cancer cells and in mice, *J Clin Invest*, 122 (2012) 3211–3220.

[66] R.A. McClelland, D. Barrow, T.A. Madden, C.M. Dutkowski, J. Pamment, J.M. Knowlden, J.M. Gee, R.I. Nicholson, Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF7 breast cancer cells after long-term culture in the presence of the pure

antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex), *Endocrinology*, 142 (2001) 2776–2788.

[67] P. Auberger, A. Puissant, Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia, *Blood*, 129 (2017) 547–552.

[68] B. Levine, M. Packer, P. Codogno, Development of autophagy inducers in clinical medicine, *J Clin Invest*, 125 (2015) 14–24.

[69] S.J. Lin, Z.R. Wu, L. Cao, Y. Zhang, Z.G. Leng, Y.H. Guo, H.B. Shang, W.G. Zhao, X. Zhang, Z.B. Wu, Pituitary Tumor Suppression by Combination of Cabergoline and Chloroquine, *J Clin Endocrinol Metab*, 102 (2017) 3692–3703.

[70] S. Endo, K. Nakata, K. Ohuchida, S. Takesue, H. Nakayama, T. Abe, K. Koikawa, T. Okumura, M. Sada, K. Horioka, B. Zheng, Y. Mizuuchi, C. Iwamoto, M. Murata, T. Moriyama, Y. Miyasaka, T. Ohtsuka, K. Mizumoto, Y. Oda, M. Hashizume, M. Nakamura, Autophagy Is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice, *Gastroenterology*, 152 (2017) 1492–1506 e1424.

[71] F. Valsecchi, C. Konrad, M. D'Aurelio, L.S. Ramos–Espiritu, A. Stepanova, S.R. Burstein, A. Galkin, J. Magrane, A. Starkov, J. Buck, L.R. Levin, G. Manfredi, Distinct intracellular sAC–cAMP domains regulate ER Ca(2+) signaling and OXPHOS function, *J Cell Sci*, 130 (2017) 3713–3727.

[72] M. Tresguerres, K.L. Barott, M.E. Barron, J.N. Roa, Established and potential physiological roles of bicarbonate–sensing soluble adenylyl cyclase (sAC) in aquatic animals, *J Exp*

Biol, 217 (2014) 663–672.

[73] K. Bernard, N.J. Logsdon, V. Miguel, G.A. Benavides, J. Zhang, A.B. Carter, V.M. Darley–Usmar, V.J. Thannickal, NADPH Oxidase 4 (Nox4) Suppresses Mitochondrial Biogenesis and Bioenergetics in Lung Fibroblasts via a Nuclear Factor Erythroid–derived 2–like 2 (Nrf2)–dependent Pathway, *J Biol Chem*, 292 (2017) 3029–3038.

[74] M. Morita, J. Prudent, K. Basu, V. Goyon, S. Katsumura, L. Hulea, D. Pearl, N. Siddiqui, S. Strack, S. McGuirk, J. St–Pierre, O. Larsson, I. Topisirovic, H. Vali, H.M. McBride, J.J. Bergeron, N. Sonenberg, mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1, *Mol Cell*, 67 (2017) 922–935 e925.

# Abstract

## Enhanced gefitinib sensitivity via the inhibition of polo-like kinase 1/FoxM1 signaling and autophagy

Im, Ji Hye

Department of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Epithelial Growth Factor Receptor–Tyrosine Kinase Inhibitor (EGFR–TKI)s have varied benefits such as higher potency and efficacy, relatively low cytotoxicity, and availability to oral administration compared to cytotoxic reagents. However, some of patients who received EGFR–TKIs remain on disease progression or relapse after achieving remission. Therefore, scrutiny of the mechanism and treatment for overcoming chemotherapy

resistance is necessary. This dissertation deliberated on the elucidation of EGFR-TKIs resistance and the suggestion for amelioration of EGFR-TKIs sensitivity in non-small-cell lung cancer (NSCLC) and breast cancer. First of all, 4 NSCLC cell lines were cultured with gradually increasing concentration of either gefitinib or erlotinib supplements for 6 months. These cell lines acquired the resistance against either gefitinib or erlotinib in cell proliferation, and increased expressions of proteins which coordinate epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer stemness phenotype. Gefitinib-resistant HCC827 (HCC827-GR) cells were shown to increase in cell migration, 3D spheroid formation, and tumor formation in nude mice compared to HCC827 parental cells. Moreover, both polo-like kinase (PLK) 1 and FoxM1 expression, which are essential for maintenance of cancer stemness, were increased. Genetic deletion of FoxM1 using siRNA transfection reduced cell proliferation, transwell migration, and 3D spheroid formation in HCC827-GR cells, while FoxM1 overexpression obtained gefitinib resistance in wild type HCC827 cells. BI2536 (a PLK1 specific inhibitor) reduced cell proliferation, 3D spheroid formation, and transwell migration in HCC827-GR

cells. In HCC827-GR xenograft model, intraperitoneal injection of 10-30 mg/kg BI2536 twice a week suppressed both tumor growth and FoxM1 expression from immunohistochemistry compared to vehicle injection.

G protein-coupled receptor 119 (GPR119) is responsible to secretion of incretin from small intestine and insulin from pancreas, but its role in cancer biology has not been investigated. Above all, GPR119 mRNA expression was detected in 8 breast cancer cell lines and protein expression was evaluated in 19 human breast tissues of 49 investigated samples. Gefitinib/GPR119 ligand treatment reduced both cell proliferation and in vivo tumor formation compared to gefitinib single treatment in MCF-7 cells. Besides, apoptosis markers, such as annexin-V positive cells or cleaved caspase-3/7 and PARP, were increased by Gefitinib/GPR119 compared to gefitinib alone. Furthermore, both LC3B II expression and autophagosome formation which are markers of functional autophagy induction were increased by gefitinib, but the cotreatment with GPR119 ligand inhibited autophagy in MCF-7 cells. This autophagy inhibition of GPR119 ligand was not observed in GPR119 knockout MCF-7 cells.

Moreover, MBX-2982 (a GPR119 ligand) reduced total ATP amount and OXPHOS, but raised glycolysis in MCF-7 cells. Lactate which is a final product of glycolysis was accumulated in both cell lysate and medium incubated with MBX-2982, 20 mM of lactate decreased LC3B II expression and facilitated cleaved caspase-3/7 activity in MCF-7 cells. In conclusion, long-term treatment of EGFR-TKIs promoted EMT/cancer stemness and resulted in the resistance, hence an approach via PLK1/FoxM1 signaling inhibition could dismiss the acquired EGFR-TKI resistance in NSCLC. Whereas, autophagy is facilitated against gefitinib, thus lactate produced by GPR119 ligand-stimulated glycolysis could enhance gefitinib sensitivity.

**Keywords:** EMT, Cancer stemness, PLK1, Autophagy, GPR119, Lactate

**Student number:** 2013-30514